

# Organogenèse et allongement de la pousse annuelle polycyclique chez le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill., 1768)



*Mémoire de dominante d'approfondissement Gestion des Milieux  
Naturels (AgroParisTech – Centre de Nancy)*



Ecole d'ingénieur **AgroParisTech**  
Centre de Nancy

**Unité mixte de recherche AMAP :**  
botanique et bioinformatique de  
l'Architecture des Plantes. CIRAD,  
IRD, CNRS, INRA, Université  
Montpellier II.

**Organogenèse et allongement de la pousse annuelle  
polycyclique chez le Pin d'Alep  
(*Pinus halepensis* Mill., 1768)**

*Mémoire de dominante d'approfondissement Gestion des Milieux Naturels  
(AgroParisTech – Centre de Nancy)*



## Résumé

Le climat méditerranéen, depuis les années 90, semble évoluer vers des étés plus chauds et plus secs. Les effets de l'intensification des stress hydriques estivaux en résultant, font l'objet de nombreuses études sur la croissance des arbres dans le sud-est de la France. Nous présentons dans ce rapport une chronologie de la croissance primaire du tronc du Pin d'Alep. Cette essence est complexe et intéressante à étudier, car elle a une croissance polycyclique (établissement de la pousse annuelle en plusieurs phases de croissance). Or, ce polycyclisme permettrait une adaptation de la croissance à des stress climatiques. La chronologie a été établie sur les données d'une année, issues de deux types de suivis mensuels : un suivi de l'allongement des pousses et un suivi de l'organogenèse (par analyse de l'intérieur du bourgeon terminal du tronc). Le site expérimental est localisé dans le sud-est de la France, les Pins d'Alep y ont été plantés il y a sept ans. Nous avons pu mettre en évidence que les deux premières unités de croissance (UC) de la pousse annuelle sont préformées dans le bourgeon entre les mois d'août et de décembre et s'allongent simultanément entre mars et juillet de l'année suivante. Ces périodes correspondent respectivement aux maxima d'intensité de l'organogenèse et de l'allongement sur le cycle annuel. Les dernières UC seraient en partie préformées, puis néoformées au moment où leur base s'allonge tandis que l'organogenèse se poursuit. La mise en place des ces UC a lieu entre la fin du printemps et la fin de l'été. Enfin, un lien entre l'absence d'une quatrième UC et un allongement précoce automnal de la pousse de l'année suivante a été mis en évidence. Cette étude pose les bases d'une réflexion sur les facteurs susceptibles d'influencer les différentes phases de la croissance du Pin d'Alep, afin d'étudier les capacités d'adaptation du polycyclisme à un climat méditerranéen contraignant.

## Abstract

Summers in Mediterranean climate seem to be hotter and drier since the nineties. This phenomenon results in more intense water stress, and its impact on tree growth is the focus of numerous studies in the south-east of France. In this report we present a chronology of the primary growth of the trunk of the Aleppo Pine. This species is complex and interesting to study because of its polycyclic growth (ability to produce several flushes in the same growing season). Indeed, polycyclism is potentially a way of adapting growth to climatic stress. The chronology was established on data over a year, coming from two types of monthly monitoring: one monitoring of the elongation of the trunk's shoot and one monitoring of the organogenesis (with an analysis of the terminal bud content). The experimental site is located in the south-east of France, where Aleppo Pines were planted seven years ago. We have observed that the two first growth units (GUs) of the annual shoot are preformed in the bud between August and December and elongate simultaneously the following year, from March to July. These periods correspond respectively to the maxima of intensity of the organogenesis and the elongation processes, across the annual cycle. The last growth units have their basis preformed and the following part is probably neoformed when it starts elongated. These GUs grow between the end of spring and the end of summer. Finally, a link was highlighted between the absence of a fourth GU and the early elongation of the following year's shoot in the autumn. This study sets down the cornerstones of a reflection on the factors that may influence the different phases of Aleppo Pine's growth, in order to study the ability of polycyclism to adapt to Mediterranean climate constraints.



## Remerciements

Je remercie l'unité mixte de recherche botanique et bioinformatique de l'architecture des plantes (UMR AMAP) de m'avoir accueillie pendant six mois pour réaliser mon stage de fin d'étude.

Ces remerciements concernent plus particulièrement Sylvie-Annabel Sabatier et Yves Caraglio qui m'ont offert leur encadrement et avec qui j'ai pu avoir de riches échanges.

Je tiens à remercier aussi Fabien Buissart, doctorant à l'institut de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) d'Aix-en-Provence, pour avoir été présent tout au long de ce stage et m'avoir offert une aide précieuse.

Merci à Christine Heinz, qui m'a aidée et encouragée à plusieurs reprises. Et merci à Gilles Le Moguedec pour ses cours de statistiques.

Je voudrais également remercier Marie-Laure De Guillen pour son encadrement administratif, ainsi que Yannick Brohard qui m'a aidé à constituer ma bibliographie.

De grands mercis à l'ensemble de l'équipe de la plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale (PHIV), qui m'a permis de réaliser mes manipulations expérimentales avec un matériel de très bonne qualité et dans un cadre chaleureux.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Fabienne Montes, Marc Lartaud et Jean-Luc Verdeil qui m'ont offert un excellent appui pendant les trois mois où j'ai travaillé dans les locaux de PHIV.

Je remercie François Lebourgeois, pour son rôle de tuteur avisé et son soutien à distance.

J'aimerais par ailleurs remercier Isabelle Greiber de l'administration AgroParisTech, pour avoir toujours su répondre de manière claire et rapide à toutes mes questions.

Enfin, je remercie l'ensemble des stagiaires et doctorants avec qui j'ai eu des échanges riches et diversifiés.

## Table des matières

Remerciements .....	1
Table des figures.....	4
Introduction .....	6
1 Matériel et méthodes .....	9
1.1 Site d'étude.....	9
1.2 Le Pin d'Alep : traits morphologiques de la pousse annuelle et fonctionnement de la croissance (organogenèse et allongement).....	10
1.3 Acquisition et saisie des données .....	13
1.3.1 Données mesurées sur le site.....	13
1.3.2 Données mesurées en laboratoire : le contenu du bourgeon apical .....	14
1.3.3 Données climatiques brutes .....	23
1.4 Analyse des données.....	23
1.4.1 Variables indicatrices de l'évolution de l'allongement au cours du temps .....	23
1.4.2 Variables indicatrices de l'évolution de l'organogenèse au cours du temps.....	23
1.4.3 Indices calculés sur les données climatiques .....	27
2 Résultats : chronologie des processus de croissance de la pousse annuelle.....	28
2.1 Les différentes périodes de l'organogenèse et de l'allongement de la pousse annuelle 2013 (et début de celle de 2014).....	28
2.1.1 Périodes d'allongement des unités de croissance successives.....	28
2.1.2 Périodes de l'organogenèse des unités de croissance successives.....	33
2.1.3 Représentation schématique des phénologies de l'organogenèse et de l'allongement des différentes unités de croissance.....	37
2.2 L'intensité des deux processus de croissance de la pousse annuelle au cours du temps (2013 et début 2014).....	39
2.2.1 Variations d'intensité de l'allongement pour chaque unité de croissance.....	39
2.2.2 Variations d'intensité de l'organogenèse pour chaque unité de croissance : volume méristématique dans le bourgeon apical.....	39
2.2.3 Représentation schématique des variations d'intensité de l'organogenèse et de l'allongement au cours du temps.....	42
2.2.4 Etude statistique des variables corrélées au volume du méristème.....	43
2.2.5 Densité des productions d'axillaires : une estimation de l'intensité de l'organogenèse entre deux dates d'échantillonnage.....	49
2.3 Bilan sur le climat.....	52
3 Discussion.....	54

3.1	Bilan sur les résultats obtenus, déclinés par objectif de départ. ....	54
3.2	Propositions de protocoles pour approfondir l'étude.....	57
3.3	Critiques sur le protocole actuel .....	60
	Conclusion.....	61
	Bibliographie citée.....	63
	Bibliographie supplémentaire consultée.....	66
	Table des annexes.....	67
	Annexe 1 : Protocole des suivis mensuels sur le site d'étude.....	68
	Annexe 2 : Diversité de tailles et de formes de méristèmes dans le monde végétal .....	72
	Annexe 3 : Récapitulatif méthodologique .....	73
	Annexe 4 : Protocoles de traitement des bourgeons.....	80
	Annexe 5 : Distances euclidiennes – Extrait de matrice.....	90
	Annexe 6 : Illustrations de la typologie des productions axillaires. ....	92
	Annexe 7 : Tableau d'entrée de l'ACP - Extrait des six premières lignes .....	101
	Annexe 8 : Allongement et accroissement de la pousse annuelle – résultats pour tous les individus suivis. ....	102

## Table des figures

Figure 1 : Plan du site expérimental .....	9
Figure 2 : Types de parcelles utilisés dans le dispositif – Pin clair et Pin dense .....	9
Figure 3 : Unité architecturale du Pin d’alep ( <i>Pinus halepensis</i> Mill., 1768s).....	10
Figure 4 : Traits morphologiques de la pousse annuelle du Pin d’Alep. ....	12
Figure 5 : Unité de croissance préformée dans le bourgeon - méristème et axillaires embryonnaires.....	12
Figure 6 : Zones méristématiques du genre <i>Pinus</i> .....	12
Figure 7 : Photo de méristème de Pin d’Alep.....	12
Figure 8 : Dernière unité de croissance allongée de la pousse annuelle de l’axe 1 .....	17
Figure 9 : Bourgeon terminal écaillé, vue du dessus (loupe binoculaire).....	17
Figure 10 : Dôme méristématique en coupe longitudinale (microscope x50).....	17
Figure 11 : Bourgeon terminal, coupe longitudinale (loupe binoculaire).....	17
Figure 12 : Bourgeon terminal, coupe histologique longitudinale (microscope x50) - photomontage .....	17
Figure 13 : Typologie des productions axillaires présentes dans le bourgeon apical.....	19
Figure 14 : Stades de chaque type d’axillaires .....	20
Figure 15 : Degrés d’indétermination.....	20
Figure 16 : Mesures sur bourgeon entier, coupe histologique longitudinale.....	22
Figure 17 : Mesures sur coupe histologique longitudinale passant par le centre du méristème.....	22
Figure 18 : Allongement des unités de croissance au cours du temps.....	30
Figure 19 : Accroissement (mm/jour) des unités de croissance au cours du temps .....	31
Figure 20 : Profil 1 : Pousse annuelle à trois unités de croissance .....	32
Figure 21 : Profil 2 : Pousse annuelle à quatre unités de croissance .....	33
Figure 22 : Analyse rétrospective : identification de l’unité de croissance en cours d’organogenèse .....	34
Figure 23 : Proportions des différents types d’axillaires de la base au sommet de chaque bourgeon.....	36
Figure 24 : Schéma bilan : phénologie de l’allongement et de l’organogenèse de chaque unité de croissance .....	38
Figure 25 : Volume méristématique de chaque bourgeon.....	40
Figure 26 : Schéma bilan : Chronologie de l’intensité de l’allongement (traits plein) et de l’organogenèse (traits pointillés) de chaque unité de croissance .....	42
Figure 27 : Cercle des corrélations .....	43
Figure 28 : Répartition des données VolMax~Volmin.....	44
Figure 29 : Répartition des données de VolMax~DensTot .....	45
Figure 30 : Répartition des données de VolMax~DensB1 .....	45
Figure 31 : Répartition des données de VolMax~DensB2 .....	45
Figure 32 : Répartition des données de VolMax~DensB2I1I2.....	45
Figure 33 : Répartition des données de VolMax~DensCb .....	45
Figure 34 : Répartition des données de VolMax~Acc.....	45
Figure 35 : Répartitions des volumes de méristème pour chaque rang d’UC en cours de formation dans le bourgeon.....	46
Figure 36 : Répartition des volumes de méristème pour chaque catégorie d’axillaires observés près du méristème .....	46
Figure 37 : Résultats des deux meilleures régressions linéaires.....	47
Figure 38 : Normalité des résidus LM1 .....	48
Figure 39 : Normalité des résidus LM 2.....	48
Figure 40 : Indépendance des résidus LM 1.....	48
Figure 41 : Indépendance des résidus LM 2.....	48

Figure 42 : Densité totale (de l'ensemble des axillaires) de chaque bourgeon.....	50
Figure 43 : Densités de chaque type d'axillaire par bourgeon .....	50
Figure 44 : Diagramme ombrothermique du site d'étude (Barbentane) .....	52
Figure 45 : Diagramme ombrothermique moyen (1997-2011) de la station météo d'Aix-en-Provence.....	52
Figure 46 : Indice d'aridité De Martone – mensuel (site d'étude).....	53
Figure 47 : Indice d'aridité De Martone – journalier (site d'étude) .....	53
Figure 48 : Nombre de jours de gelées (site d'étude).....	53
Figure 49 : Nombre de jours de gelées moyens (1997-2011) de la station météo d'Aix-en-Provence.....	53

## Introduction

L'objet de la présente étude est d'établir une chronologie de la croissance annuelle du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill., 1768). Il s'agit d'une essence méditerranéenne, dont la croissance primaire est rythmique et polycyclique, c'est-à-dire qu'elle alterne des phases d'activité et de repos au cours d'une même saison de végétation. Cette périodicité est liée à l'activité du méristème apical (cf. partie 1.2) qui marque des pauses plus ou moins régulières. Pendant la phase de temps où le méristème fonctionne en continu, il met en place ce qu'on appelle une unité de croissance (UC). Une pousse annuelle polycyclique est donc constituée d'une succession d'UC, celle du Pin d'Alep montre généralement trois ou quatre.

Les unités de croissance présentent, une fois allongées, des traits morphologiques particuliers à leur rang sur la pousse annuelle. La pousse annuelle comporte donc des marqueurs (zone de cataphylles ou feuilles écailleuses, présence de cônes femelles, pseudoverticille de rameaux, etc.) du début et de la fin de sa croissance, ainsi que de ces pauses intermédiaires qui sont propres au polycyclisme. La lecture de ces traits morphologiques dans le but de retracer l'histoire de la croissance d'un axe, s'appelle l'analyse rétrospective (Taugourdeau et al., 2012).

Le caractère polycyclique de la croissance du Pin d'Alep est intéressant dans la mesure où il pourrait constituer un potentiel d'adaptation au climat méditerranéen. Ce climat se caractérise par des phénomènes de sécheresses estivales, dues à des températures élevées et une pluviométrie faible (voir Le Houérou, 2005 in Thabet et al., 2009), qui peuvent être particulièrement contraignants pour la croissance des végétaux.

L'évolution récente du climat méditerranéen (attribuée au changement climatique) et ses effets sur la croissance des arbres, font l'objet de plusieurs études, dans le but d'appréhender l'avenir des forêts méditerranéennes. En effet, depuis 1998 un climat beaucoup plus chaud et sec que la normale a été constaté dans le sud-est de la France (Girard et al. 2011). Des études sur le Pin d'Alep et d'autres essences méditerranéennes (Vennetier et al., 2012) ont mis en évidence, grâce aux principes de l'analyse rétrospective, que la canicule de 2003 a eu pour effet de réduire le taux de polycyclisme (c'est-à-dire le nombre d'UC sur une pousse annuelle, corrélé positivement à la taille des pousses). Les conséquences de cet intense stress hydrique se sont étendues jusqu'en 2007, en raison d'épisodes de sécheresse répétés (Girard et al., 2011). En revanche, une augmentation du taux de polycyclisme a été constatée entre 2008 et 2010, sous un climat moins contraignant (Girard et al., 2012).

*A contrario*, le changement climatique a également pour conséquence un allongement de la saison de végétation, par avance du débourrement au printemps et retard de la fin d'activité de la croissance à l'automne (Vennetier et al., 2011). En l'occurrence, certaines études ont prouvé que la croissance en hauteur du Pin d'Alep s'est fortement accélérée entre les années soixante et l'an 2000 (Vennetier *et al.*, 1999).

Finalement, comprendre si le phénomène de polycyclisme chez le Pin d'Alep lui confère un potentiel adaptatif aux changements climatiques brutaux— soit par une croissance primaire accrue lorsque le climat est favorable, soit par une restriction de son développement, le protégeant des épisodes intenses de sécheresse — est un enjeu de premier ordre. Le Pin d'Alep n'étant pas la seule espèce polycyclique que l'on trouve sous climat méditerranéen (certaines espèces monocycliques sont polycycliques sous ce climat, ex. : le Pin sylvestre), l'étude des liens entre le climat et ce mode de croissance apporterait des éléments aux problématiques de gestion future des forêts méditerranéennes et de maintien d'un couvert forestier diversifié en essence.

Pour comprendre les impacts potentiels du climat sur la croissance polycyclique du Pin d'Alep, il est nécessaire d'en connaître précisément les mécanismes et la chronologie. De manière générale, la croissance primaire comprend deux processus : l'organogenèse et l'allongement des tiges. Ces processus, dans le cadre d'une croissance rythmique, sont rarement simultanés. Bien souvent, une partie de la pousse annuelle est préformée dans le bourgeon hivernal et s'allonge au printemps.

La littérature scientifique qui porte spécifiquement sur la croissance du Pin d'Alep, étudie surtout la chronologie de l'allongement et les effets des variations inter-annuelles du climat sur ce processus. Comme mentionnées précédemment, les études concernées (Girard et al., 2012, 2011; Venetier et al., 2011, 2012) mettent en évidence un impact négatif des forts stress hydriques sur le taux de polycyclisme. D'autres recherches ont prouvé que le polycyclisme du Pin d'Alep est également régit par des facteurs endogènes comme l'identité génétique des individus (Esteban et al. 2010; Pardos et al. 2003), la vigueur des axes étudiés et leur positionnement dans le houppier de l'arbre (Girard et al., 2011; Pardos et al., 2003; Venetier et al., 2011). Dans l'étude du vivant en milieu naturel, il est d'ailleurs souvent difficile de distinguer clairement les facteurs internes aux individus, des facteurs externes propres au milieu.

Concernant l'impact des variations intra-annuelles du climat (degrés jours, cumul des précipitations) sur la phénologie de la croissance, on le retrouve surtout dans des études portant sur d'autres pins, souvent monocycliques et rarement en contexte méditerranéen. L'impact du temps thermique et/ou des cumuls de précipitations est étudié sur l'allongement ou l'organogenèse des pousses annuelles de *Picea glauca* (Moench) Voss 1907, *Pinus nigra* RLegay 1785, *Pinus sylvestris* L., 1753 et *Picea abies* (L.) Karst 1881, avec des résultats plus ou moins convergents selon les espèces (Guyon, et al., 1987b; Owens & Marje, 1977a; Schiestl-Aalto, et al., 2013; Sutinen, et al. , , 2012).

D'autres recherches, datant des années cinquante aux années soixante-dix, portent plus largement sur les mécanismes de la croissance chez les pins, sans prendre en compte l'impact du climat. Les pins étudiés sont, encore une fois, pour la plupart monocycliques et de milieux tempérés (*Pinus lambertiana* Dougl. 1827, *Pinus ponderosa* C.Lawson 1836, *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. 1838 et *Pinus pinaster* Aiton 1789). Certaines de ces études apportent beaucoup d'informations sur les traits morphologiques des pousses annuelles, marqueurs d'une rythmicité de la croissance, et sur les étapes principales du développement de la tige et des organes qu'elle porte (Debazac, 1962, 1966; Owens, 2006). D'autres études, portent plus précisément sur le développement au cours du temps des organes latéraux tels que les aiguilles (brachyblastes), les branches et les cônes (Owens & Marje, 1973; Sacher, 1954, 1955).

Il reste difficile de trouver des études précises de la phénologie de l'organogenèse. Marie-Noëlle Jordy (2004) a fait des recherches sur les variations d'activité du méristème et d'allocation des réserves au cours d'une année chez le Pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton 1789). Cette étude met clairement en évidence les corrélations entre le volume méristématique et la présence de différents métabolites secondaires sous le méristème, mais elle ne relie pas ces événements à la chronologie de l'allongement des pousses monocycliques étudiées.

Finalement, l'originalité de l'étude qui constitue ce mémoire, tient dans le fait qu'elle porte principalement sur la construction d'une chronologie de l'organogenèse chez le Pin d'Alep, une espèce dont la pousse annuelle est fortement polycyclique, dans un contexte climatique méditerranéen. Cette chronologie est ensuite confrontée à celle de l'allongement de la pousse annuelle, afin d'appréhender l'ensemble des processus de la croissance de l'espèce étudiée. L'expérimentation porte sur le tronc d'individus âgés de sept ans, issus de la même population, originaires de la même pépinière et se développant dans le même contexte environnemental. Ces paramètres expérimentaux visent à fixer différents facteurs qui influencent la croissance : la catégorie d'axe, l'âge des individus, la compétition entre individus, l'identité génétique et le contexte stationnel. Pour établir la chronologie de l'organogenèse et de l'allongement des pousses, un suivi phénologique mensuel est réalisé sur deux ans (de mars 2013 à mars 2015). Les effets des variations climatiques intra-annuelles sur ces chronologies seront étudiés *a posteriori*.

Au vu du peu d'information concernant le sujet, cette étude est principalement exploratoire. Elle a pour objectif de juxtaposer des faits via des propositions de chronologies de la croissance (propres au site expérimental, à l'âge et à l'identité génétique des individus suivis). Les résultats de cette étude permettront par la suite, d'émettre de nouvelles hypothèses et d'identifier des fenêtres de temps plus précises avec un

échantillonnage adapté, pour obtenir des conclusions causales sur les liens entre le climat et la croissance du Pin d'Alep.

Cette étude vise donc à répondre aux objectifs suivants concernant la pousse annuelle polycyclique du Pin d'Alep :

- ⇒ Proposer une chronologie de son allongement
- ⇒ Proposer une chronologie de son organogénèse
- ⇒ Etudier les liens entre les deux chronologies :
  - Existe-t-il des périodes de simultanéité des deux processus ?
  - Est-ce que l'allongement empêche ou ralentit l'organogénèse ? Et inversement ?

Le but sera par la suite de relier des facteurs climatiques à la chronologie de la croissance proposée.

Ce rapport présentera d'abord le contexte expérimental (site d'étude, objet d'étude, types de suivis temporels menés sur le terrain), puis les méthodes d'analyse adoptées. Dans un deuxième temps, il développera les résultats obtenus et les propositions de chronologies qui en découlent. Enfin, la robustesse et la pertinence des résultats seront discutées dans une troisième partie, qui contiendra également des suggestions vis-à-vis de protocoles futurs.

# 1 Matériel et méthodes

## 1.1 Site d'étude

Le dispositif expérimental de cette étude est localisé sur la commune de Barbantane dans les Bouches-du-Rhône, à une dizaine de kilomètres au sud-ouest d'Avignon (coordonnées : 43,886634°N 4,74628°E). Il fut à l'origine mis en place dans le cadre d'un projet de l'Institut de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea) d'Aix-en-Provence en 2008 (Prévosto et al., 2009), pour étudier la survie, la croissance et le développement de Chênes méditerranéens (Chêne blanc, *Quercus pubescens* Willd., 1976 et Chêne vert, *Quercus ilex* L., 1753) en mélange avec une végétation ligneuse d'accompagnement constituée de Pin d'Alep et ou de Coronille (*Coronilla valentina* subsp. *Glauca* (L.) Batt.). La parcelle est une ancienne friche agricole – le sol a probablement une bonne fertilité et une bonne réserve en eau – et elle est fortement exposée aux vents.

Les plants d'arbres, âgés de près d'un an, ont été plantés début 2008 dans 80 placettes de 2 × 2,5 m réparties en 8 blocs (soit 10 placettes par bloc), voir annexe 1 pour plus de détails. Quatre types de mélanges d'essences ont été essayés dans ces différentes placettes. Les placettes sur lesquelles nous avons travaillé dans cette étude sont celles avec un peuplement dense ou clair de Pin d'Alep, chaque fois mélangé soit à du Chêne vert, soit à du Chêne blanc (fig. 1 et 2).

Aujourd'hui, le Pin a très clairement pris le dessus sur les Chênes et les placettes pourraient presque être considérées comme des peuplements homogènes de Pin d'Alep. Tous les arbres plantés ont été élevés à la pépinière administrative des Milles (13), les Pins sont donc *a priori* relativement proches génétiquement. Les Pins d'Alep sont aujourd'hui (en 2014) âgés de 7 ans et font en moyenne 3.5 m de hauteur, avec un diamètre moyen (dbh) de 37 mm, ce qui est nettement supérieur aux moyennes en station naturelle.



Figure 1 : Plan du site expérimental – CB : Chêne blanc, CV : Chêne vert, Pdense : Pin d'Alep dense, Pclair : Pin d'Alep clair, Co : Coronille. (Prévosto et al., 2009)

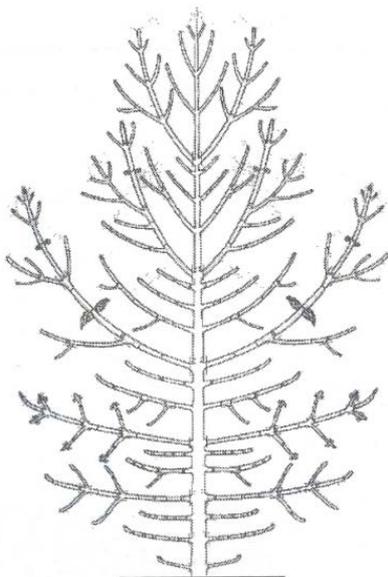
Figure 2 : Types de parcelles utilisés dans le dispositif – Pin clair et Pin dense (Prévosto et al., 2009)

## 1.2 Le Pin d'Alep : traits morphologiques de la pousse annuelle et fonctionnement de la croissance (organogenèse et allongement)

### Traits morphologiques de la pousse annuelle polycyclique du Pin d'Alep :

Le Pin d'Alep peut être décrit d'abord par le modèle architectural de Rauh (Hallé, Oldeman, & Tomlinson, 1978), qui stipule que tous les axes ont une croissance verticale (ils sont orthotropes), rythmique, et que les organes sexuels sont formés dans des bourgeons latéraux et non terminaux. Pour cette espèce, a également été décrite une unité architecturale qui est représentée par le diagramme et la table de la figure 3. Elle définit le nombre, la nature et l'agencement des différentes catégories d'axes de l'arbre (Daniel Barthélémy & Caraglio, 2007).

Nous nous intéressons dans cette étude au tronc, qui constitue l'axe d'ordre 1. Nous pouvons lire dans la table 3b, que le tronc a une croissance verticale (orthotrope) et indéfinie, c'est-à-dire que le méristème apical de la tige maintient son potentiel de croissance tout au long de la vie de l'arbre (Daniel Barthélémy & Caraglio, 2007). Le tronc porte aussi des cônes femelles et il a une croissance rythmique exprimée par une pousse annuelle (PA) polycyclique. Cette PA peut se composer de deux à quatre unités de croissance (UC). On notera, dans la table d'unité architecturale, que de manière générale le taux de polycyclisme est un discriminant du comportement des axes selon leur position dans l'arbre et en relation avec leur sexualité.



axes principaux

trunk	branches	twigs	ramlets	short axes (brachyblasts)
orthotropic	orthotropic	orthotropic	orthotropic	ageotropic
indefinite growth	indefinite growth	indefinite growth	indefinite growth	definite growth
	delayed branching	delayed branching	delayed branching	immediate branching
three to ten axillary productions	two to six axillary productions	until two axillary productions	no axillary production	no axillary production
female cone	female cone	male cones	male cones	not sexualised
polycyclic up to four cycles	polycyclic up to three cycles	polycyclic up to two cycles	monocyclic	monocyclic

3b. Table descriptive de la différenciation morphologique, du type de croissance, du type de ramification et de la sexualité de chaque catégorie d'axe.

**Figure 3 : Unité architecturale du Pin d'alep (*Pinus halepensis* Mill., 1768s)** (Barthelemy, Caraglio, & Sabatier, 2000)

Les unités de croissance correspondent aux portions d'axe mises en place pendant une phase de croissance active. Elles peuvent être identifiées via des étages de productions latérales, telles que des branches ou des cônes, qui marquent la fin de chaque UC (voir le dessin de la figure 4). Leurs traits morphologiques constituent, à posteriori, des témoins de la croissance rythmique de l'arbre au cours d'une saison de végétation.

La phyllotaxie des pousses est alterne-spiralée, deux à trois hélices sont imbriquées tout autour de l'axe du tronc (visible sur la figure 9 p. 17, qui présente le bourgeon terminal vu du dessus). Le long de ces hélices sont disposées des feuilles qui peuvent soit ne rien comporter à leur aisselle, on les appellera dans ce rapport des « cataphylles » ; soit axillier trois types d'organes :

- les brachyblastes = rameaux nains porteurs d'écailles et de deux à trois feuilles ;

- les rameaux courts ou les rameaux longs (mésos et auxiblastes) = axes d'ordre 2 qui constitueront les branches, décrits dans le tableau d'unité architecturale (fig. 3) ;
- les cônes femelles = organes reproducteurs femelles.

Dans ce rapport, pour plus de simplicité dans le vocabulaire employé, seront appelés « productions axillaires » ou « axillaires », tous les organes visibles le long de l'axe ; c'est-à-dire les cataphylles, les brachyblastes, les rameaux et les cônes.

Chaque unité de croissance (et toutes les productions axillaires qu'elle porte) est créée au sein du bourgeon par un méristème apical : c'est l'organogenèse. Suite à l'organogenèse, les entre-nœuds qui séparent les feuilles s'allongent, c'est le processus d'allongement. La croissance en longueur du tronc se compose donc de deux processus : l'organogenèse, puis l'allongement.

#### Les mécanismes de l'organogenèse au sein du bourgeon :

Le bourgeon est, par définition, la structure qui protège la partie apicale de la tige, c'est-à-dire le méristème et les organes embryonnaires. Le méristème (Brice, 2011) est un ensemble de cellules végétales indifférenciées qui se divisent activement et forment ainsi de nouvelles cellules. Ces nouvelles cellules se différencient ensuite pour former les différents tissus de la plante (qui vont constituer, entre autres, des organes tels que les branches et les aiguilles). Le méristème peut être par ailleurs, de taille très variable selon le végétal, plusieurs cas sont rassemblés en annexe 2.

Le méristème apical est composé de différentes zones, illustrées par la figure 6. La zone centrale donne naissance aux zones périphériques et médullaires. Ces dernières donnent à leur tour naissance à des tissus différents : la zone médullaire est à l'origine de la formation de la moelle centrale de la pousse, et les zones périphériques donnent naissance aux axillaires (cataphylles, brachyblastes, rameaux longs et courts, cônes).

Lors de la mise en place des axillaires, on observe sur le méristème, des soulèvements des zones périphériques appelés des primordia, qui constituent le plus jeune stade de différenciation d'un axillaire (voir figure 7). L'intervalle de temps qui s'écoule entre l'apparition de deux primordia successifs est appelé le plastochrone. Au cours de cet intervalle, qui peut être plus ou moins court, le méristème change de forme et de volume : il atteint son volume maximal juste avant l'apparition du primordium et son volume minimal juste après que le primordium soit différencié.

Si le méristème change de forme au cours d'un plastochrone, des variations de plus grande amplitude ont aussi lieu à l'échelle du cycle de végétation : selon la quantité de primordia générés par unité de temps, les extrema de taille du méristème vont changer. Lorsque le méristème est en dormance (en hiver par exemple), son volume atteint le strict minimum possible, et lorsque le méristème est à son maximum d'intensité d'organogenèse (maximum d'organes créés par unité de temps, au printemps par exemple) son volume atteint lui aussi un maximum absolu, et son plastochrone devient très court. Finalement, le volume du méristème est donc un indicateur intéressant de son activité, mais ses variations sont à considérer sur plusieurs échelles de temps (celle d'un plastochrone et celle d'une année).

Les unités de croissances successives sont soit préformées dans le bourgeon hivernal, soit « néoformées ». La préformation implique que l'ensemble des axillaires et des entre-nœuds d'une unité de croissance soit présent à un stade embryonnaire dans le bourgeon, avant que les entre-nœuds ne commencent à s'allonger. La néoformation décrit le phénomène d'organogenèse d'une UC lorsqu'il est simultanément à son allongement, les deux processus ne sont alors plus distincts dans le temps. L'hypothèse principale pour le Pin d'Alep est que les UC 1 et 2 seraient préformées l'année avant leur allongement (Girard et al., 2011) ; tandis que les dernières UC (3 ou 4) seraient « néoformées » au cours de l'année d'allongement de la pousse annuelle.

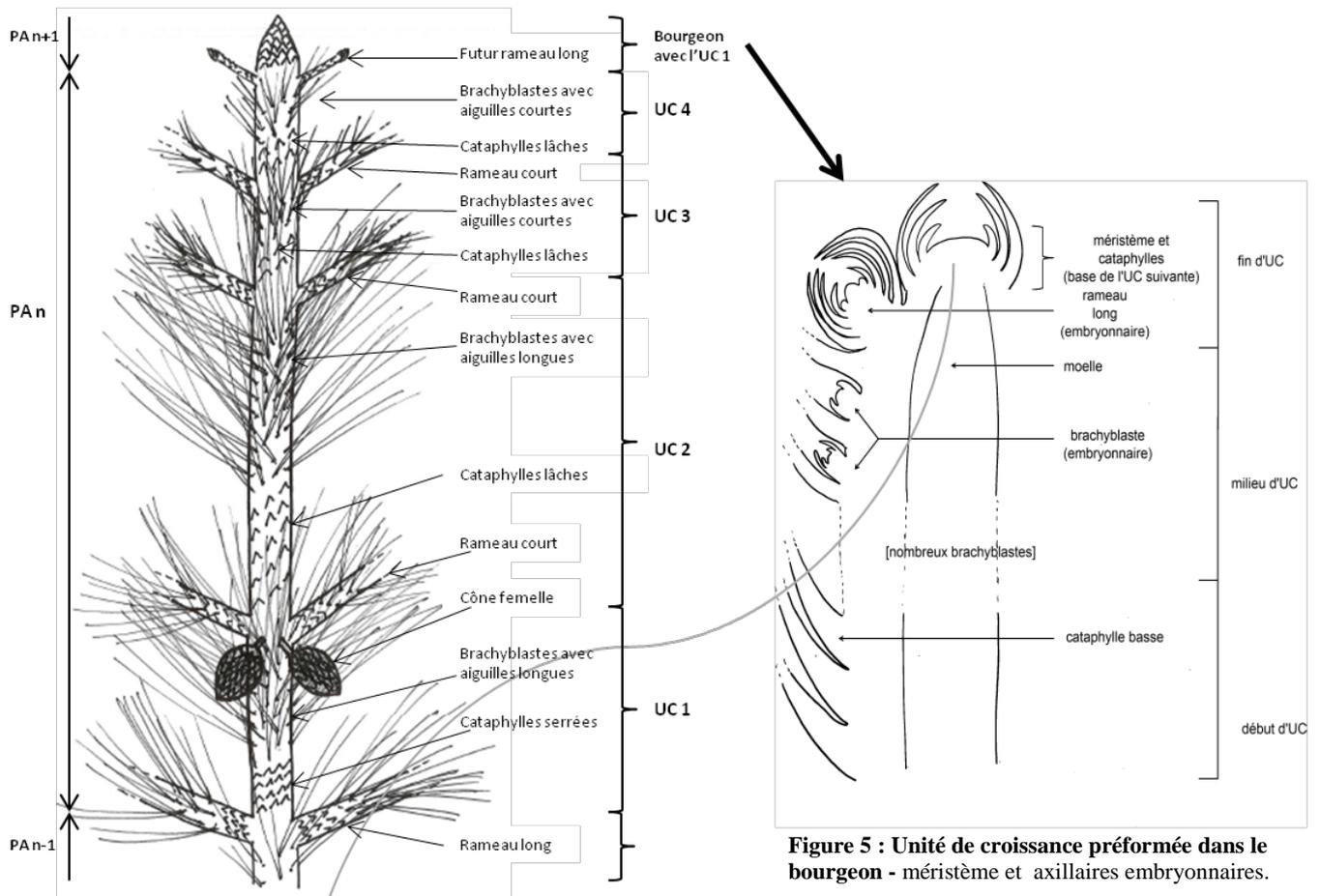
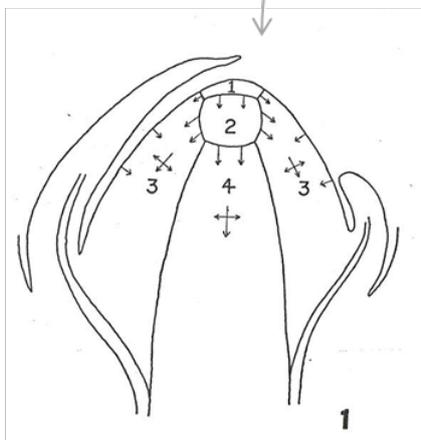


Figure 4 : Traits morphologiques des UC successives de la pousse annuelle du Pin d'Alep.



1	2	3	4
Cellules initiales de l'apex	Cellules mère centrale	Tissu périphérique	Tissu médullaire
Zone centrale		Zone périphérique	Zone médullaire

Figure 6 : Zones méristématiques du genre *Pinus* : représentation et caractéristiques (Sacher, 1954)

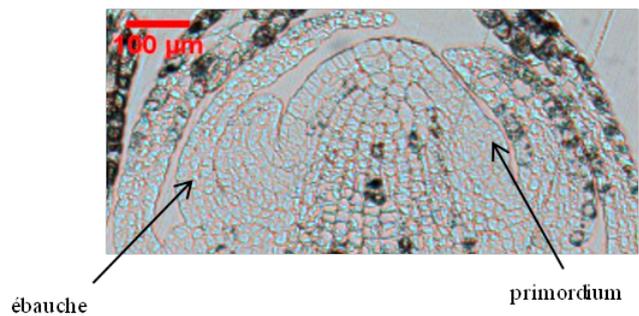


Figure 7 : Photo de méristème de Pin d'Alep

Comme il a été annoncé en introduction, l'objectif principal de cette étude est de mettre en parallèle les moments de l'année auxquels les différentes unités de croissance sont formées (préformées ou néoformées) et ceux auxquels elles sont allongées. Des suivis dans le temps ont donc été mis en place afin d'étudier la chronologie des processus d'organogenèse et d'allongement du tronc chez le Pin d'Alep.

### 1.3 Acquisition et saisie des données

Deux suivis distincts de la croissance du tronc sont réalisés sur le dispositif expérimental de Barbantane : un suivi de l'allongement et un suivi de l'organogenèse de la pousse annuelle. Le suivi est mensuel et se fait sur deux ans, de mars 2013 à mars 2015. Au cours du stage, ce sont les données du suivi de la première année qui furent utilisées.

#### 1.3.1 Données mesurées sur le site (le protocole détaillé des suivis est en annexe 1).

##### Suivi mensuel de l'allongement :

Vingt placettes ont été sélectionnées sur le dispositif de quatre-vingts placettes (ou plot, fig.1) : dix placettes avec un peuplement dense et dix placettes avec un peuplement clair. Deux individus par placette ont été numérotés et identifiés sur le terrain. Le suivi de l'allongement se fait donc sur quarante individus au total, qui vont être suivis pendant deux ans (sauf en cas de mort de l'apex, le suivi se poursuit alors sur une branche relais).

Pour établir l'état initial de chaque individu, les pousses de 2010 à 2012 ont été décrites sur le tronc en décembre 2012. A partir de mars 2013 et jusqu'en mars 2015, l'état de la pousse annuelle du tronc, en cours de formation, est décrite tous les mois.

L'état de la pousse annuelle est détaillé par unité de croissance. Chaque UC est décrite par :

- son rang au sein de la PA ;
- sa longueur ;
- le nombre et le(s) type(s) d'axillaires du pseudoverticille (rameaux longs, rameaux courts, cônes ou bourgeons) ;
- un stade phénologique (cf. annexe 1).

Pour rappel, on repère la fin d'une UC grâce à la présence du pseudo-verticille (étage de productions axillaires telles que des rameaux ou des cônes) qui est en position terminale du fait que l'UC soit acrotone (fig. 4 et 5). Au début du suivi, en mars 2013, la première UC de la PA de 2013 est reconnaissable sous le bourgeon car elle est couverte de cataphylles serrées, c'est-à-dire séparées par des entre-nœuds courts. La dernière UC de 2012, elle, comporte soit des aiguilles courtes, soit des cataphylles mais dont on observe bien les entre-nœuds allongés (car cette UC finit son allongement l'année précédente). La première UC de la PA 2013 est donc appelée UC 1, puis les UC suivantes sont notées selon leur ordre d'apparition (c'est-à-dire leur rang sur la pousse annuelle).

##### Suivi mensuel de l'organogenèse :

A la même date que le suivi d'allongement (une fois par mois), dix individus sont choisis aléatoirement sur la plantation (avec annotation du critère dense ou clair du plot concerné) et le bourgeon terminal du tronc (axe d'ordre 1 ou A1) est prélevé. Chaque mois, dix bourgeons terminaux de Pin d'Alep sont ainsi récoltés

sur dix individus différents (puisque c'est un échantillonnage destructif), qui sont bien sûr distincts des individus suivis en allongement.

La PA à laquelle appartient chaque bourgeon prélevé est décrite de la même manière que pour le suivi d'allongement, et les PA sous-jacentes de 2012 et 2011 sont également mesurées. Cette description des PA sous le bourgeon, pour chaque individu échantillonné, est appelée « analyse rétrospective ». Elle ne constitue pas un suivi dynamique mais un constat, à l'instant  $t$  de l'échantillonnage. Cette analyse est fondamentale pour savoir quelle UC est en cours de formation au sein du bourgeon.

L'identification du rang des unités de croissance se fait selon les critères morphologiques décrits dans la partie 1.2 et si ces derniers ne sont pas encore visibles du fait que l'UC n'ait pas fini son allongement, les doutes seront levés par la comparaison avec le suivi dynamique d'allongement qui permettra de connaître les dates les plus fréquentes de début et fin d'allongement de chaque unité de croissance pour les Pins d'Alep du site d'étude.

#### Remarque :

L'échantillonnage des bourgeons terminaux étant destructif, il est important d'insister sur le fait que le suivi d'allongement est réalisé sur des individus différents de ceux sur lesquels on prélève les bourgeons et que les dix échantillons de bourgeon d'une date de prélèvement proviennent d'arbres différents.

Cependant, l'hypothèse de comparabilité des échantillons est avancée, car le dispositif expérimental et le protocole permettent de fixer plusieurs paramètres qui influencent l'expression de la croissance primaire :

1. l'âge des individus ;
2. l'origine des plants de Pin ;
3. la catégorie d'axe étudiée ;
4. l'effet de compétition (séparation des plots denses / clairs et bourgeon terminal du tronc moins soumis à la concurrence que d'autres branches) ;
5. les paramètres environnementaux.

De retour du terrain, les données des deux suivis (allongement et organogenèse) sont saisies sous format Multiscale Tree Graph (Godin & Caraglio, 1998). Ce format permet de garder trace de tous les niveaux structurels de la plante. Pour cela, il utilise un codage qui intègre les relations topologiques entre les différentes parties de l'arbre décrit. Pour le suivi de l'allongement, le format Multiscale Tree Graph (MTG) permet également d'illustrer la dynamique de croissance des pousses. Les données sont extraites à partir du MTG en utilisant le logiciel Xplo (Griffon & Coligny, 2014).

### **1.3.2 Données mesurées en laboratoire : le contenu du bourgeon apical**

Notre objectif est d'établir une chronologie de l'organogenèse sur un cycle de croissance. Pour cela, on cherche à connaître :

- les dates de début et de fin de création de chaque unité de croissance ;
- les principales variations d'intensité de l'organogenèse (c'est-à-dire l'activité méristématique) au cours du temps.

Le méristème, ainsi que les pièces nouvellement générées par ce dernier, sont enfermées au sein de la structure protectrice que constitue le bourgeon. Il nous faut donc observer ce que contient l'intérieur des bourgeons à chaque date d'échantillonnage.

Pour connaître le début et la fin de l'organogenèse de chaque UC, deux types d'information sont nécessaires :

- savoir quelle UC (1, 2, 3, ou 4) est préformée dans le bourgeon ;
- savoir si on observe le début, le milieu ou la fin de l'organogenèse de l'UC identifiée.

L'UC en cours d'organogenèse sera identifiée grâce à l'analyse rétrospective de l'allongement de la pousse sur laquelle on prélève le bourgeon. Pour le deuxième point, nous allons chercher à identifier les axillaires à l'état embryonnaire et à prendre des mesures qui nous permettront d'estimer l'état d'avancement de l'organogenèse de l'UC.

Quant aux variations d'intensité de l'organogenèse au cours du temps, les mesures vont se concentrer sur deux aspects :

- variations du volume méristématique ;
- estimation de la densité des axillaires observés dans le bourgeon.

Les méthodes d'analyse présentées dans cette partie tendent à répondre aux objectifs cités ci-dessus.

### 1.3.2.1 Méthode de traitement des échantillons (bourgeons) – figures 8 à 12

La mise en place du protocole de coupe et la réflexion qui gravite autour de cette dernière ont constitué une grande partie du stage. Un compte-rendu détaillé du processus a donc été rédigé et se trouve en annexe 3.

#### Conservation des bourgeons récoltés sur le terrain :

Au retour du terrain les bourgeons sont écaillés puis placés dans du fixateur (Glutaraldéhyde - Paraformaldéhyde - Caffeine) afin de figer les cellules du matériel végétal dans un état proche de celui où elles se trouvaient sur l'arbre (le protocole de fixation se trouve en annexe 4). Pendant que le bourgeon est dans le fixateur, plusieurs dégazages sont réalisés à intervalles réguliers. Après la fixation, les bourgeons sont déshydratés par des bains d'alcool éthylique à 50 puis 70 % et peuvent être conservés dans ce dernier bain à 4°C (pour une durée indéterminée).

#### Coupe des échantillons au microtome :

Le protocole de coupe des bourgeons étant très coûteux en temps, seulement deux bourgeons sur les dix prélevés par date ont été analysés. Chaque bourgeon est identifié par sa date de prélèvement mensuel et un numéro d'individu sur le site, qui permet de le rattacher aux données prises sur le terrain concernant les UC sous-jacentes au bourgeon (cf. 1.2.1. « suivi de l'organogenèse »).

Afin d'observer ce que contiennent les échantillons prélevés, de fines coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (cf. annexe 3). Pour cela, il faut au préalable imprégner chaque bourgeon de résine, afin que le matériel végétal puisse rester intègre à la coupe, et inclure les bourgeons dans un bloc de cette même résine qui sera ensuite découpé au microtome. Plusieurs traitements des échantillons sont nécessaires afin que la résine pénètre bien dans les tissus : dissection du bourgeon à la loupe binoculaire puis passages par des bains successifs de différents alcools pendant lesquels on réalise des étapes de dégazage (afin de retirer l'air emprisonné dans le matériel végétal). Les échantillons emprisonnés dans les blocs de résine sont placés à l'étuve (37°C) pour conservation (l'ensemble des protocoles concernés sont présentés dans l'annexe 4, et les détails des manipulations sont en annexe 3).

### Sélection et photographies des coupes :

Afin de pouvoir récolter des données sur les coupes, ces dernières sont sélectionnées pour être prises en photo grâce à une caméra montée sur un microscope. Des données et des mesures sont ensuite prises sur les photos en utilisant des plugins du logiciel Image J (Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012). Ces plugins ont été réalisés par Marc Lartaud de la plateforme PHIV (Plateforme d’Histocytologie et d’Imagerie cellulaire Végétale). La sélection des coupes histologiques est conditionnée par les données que nous souhaitons mesurer et qui sont exposées dans l’introduction de cette partie 1.3.2 : savoir, pour chaque bourgeon, si on observe le début, le milieu ou la fin de l’organogenèse d’une UC ; estimer une intensité de l’activité du méristème.

Les coupes sélectionnées se départagent donc en deux catégories :

- Des coupes passant au mieux par le centre du bourgeon sur toute sa longueur, afin d’identifier au mieux les axillaires et d’estimer leur densité. Les critères de sélection sont les suivants :
  - plus grande largeur de moelle possible avec les cellules de la moelle alignées (fig. 12) ;
  - axillaires bien dans le plan de coupe, si possible avec une continuité visuelle des tissus de la moelle du bourgeon et de la moelle des axillaires (fig.12).
- Une coupe passant le plus proche possible du centre du dôme méristématique (fig. 10), afin d’en estimer la taille. Le critère de sélection est de pouvoir observer le plus nettement possible les différentes zones méristématiques décrites dans la partie 1.2 (fig. 6).

*N.B. : Aucune coloration n’a été faite car la morphologie et la constitution des bourgeons est suffisamment visible sans. L’ensemble des lames est conservé pour d’éventuelles études plus précises des tissus qui nécessiteraient des colorations.*

L’objectif du microscope utilisé pour prendre les photos est un x5. Si on ajoute à cela les critères propres à la caméra, les images ont une échelle de 1 pixel pour 1.4663  $\mu\text{m}$  (ce qui n’est pas très éloigné d’une observation avec un oculaire x10, soit 50 fois la taille réelle).

Deux plugins sous le logiciel Image J ont permis de travailler sur les photos de coupes :

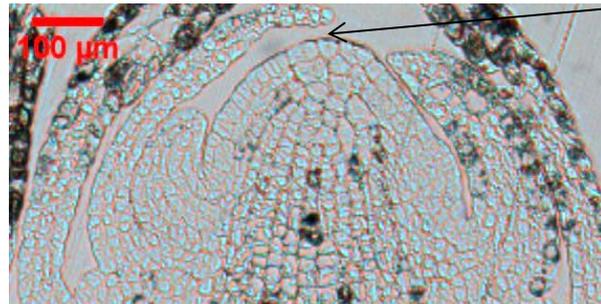
- un plugin permettant d’assembler des mosaïques de photos : pour être analysées au bon grossissement, les coupes passant par le centre de la moelle (sur toute la longueur du bourgeon) ont été photographiées zone par zone puis reconstituées (fig. 12) ;
- un plugin permettant d’aligner des photos afin de mettre en évidence leurs différences, en les faisant défiler successivement : la coupe passant le plus près possible du centre du dôme méristématique a été sélectionnée, en prenant en photo toutes les coupes qui semblaient passer par le centre et en faisant défiler ces photos dans leur ordre d’avancée dans la coupe du bourgeon.



**Figure 8 : Dernière unité de croissance allongée de la pousse annuelle de l'axe 1. Les brachyblastes sont en cours d'allongement. 24 Avril 2014**



**Figure 9 : Bourgeon terminal écaillé, vue du dessus (loupe binoculaire)**



**Figure 10 : Dôme méristématique en coupe longitudinale (microscope x50)**



**Figure 11 : Bourgeon terminal, coupe longitudinale (loupe binoculaire)**



**Axillaires :** coupés longitudinalement, tissus communiquant avec la moelle si possible

**Moelle :** plus grand diamètre possible et cellules alignées.

**Figure 12 : Bourgeon terminal, coupe histologique longitudinale (microscope x50) - photomontage**

### 1.3.2.2 Prise de données et mesures sur les coupes

#### Données et mesures prélevées sur les photos :

Pour rappel, les données d'observation qui nous intéressent ont pour but de déterminer d'une part, l'état d'avancement de l'organogenèse de chaque unité de croissance, d'autre part un niveau d'activité méristématique.

Pour déterminer l'état d'avancement de l'organogenèse de l'UC, il est nécessaire de pouvoir identifier et quantifier les axillaires observables sur les coupes du bourgeon. Une typologie a donc été établie afin d'aider à leur identification. Cette typologie attribue également un degré de maturité aux brachyblastes et aux rameaux. Elle est présentée en figure 13, avec des schémas explicatifs figure 14.

La réalisation d'une typologie fut d'autant plus importante que tous les axillaires n'ont pas pu être identifiés, même après observation de l'ensemble des coupes d'un échantillon. En effet, il n'est pas toujours aisé de déterminer la nature d'une ébauche d'axillaire lorsque cette dernière n'est jamais correctement dans le plan de coupe, ou lorsqu'elle est trop peu différenciée pour pouvoir être identifiée. A ces ébauches a donc été attribué un type « indéterminé », avec des degrés d'indétermination différents selon les indices offerts par la coupe. La typologie (fig.13) et le schéma de la figure 15 expliquent ces catégories particulières. En annexe 6 se trouvent des exemples photographiques de chaque type d'axillaire présenté dans la typologie.

Pour quantifier les axillaires, on ne peut donner *in fine* qu'un indicateur de la quantité totale car on n'en observe qu'une partie sur les coupes, en raison de la phyllotaxie alterne-spiralée. Cependant, ces données de quantité (ou de densité) des axillaires sont à considérer dans un but de comparaison entre les bourgeons ; environ la même proportion d'axillaires sera captée par cette méthode pour tous les échantillons. Les figures de la page 17 permettent de visualiser la partie des axillaires de la tige qui est prise en compte sur une coupe longitudinale.

Concernant l'évaluation d'un niveau d'activité méristématique, il a été décidé de l'approcher par une estimation du volume du méristème. Cependant, ces estimations de volume apportent un biais quant à l'évaluation de l'intensité d'activité d'organogenèse pour deux raisons :

- Le méristème est observé dans un plan alors que la phyllotaxie est alterne spiralée. Cela signifie que nous n'observons pas l'ensemble des primordia émis par le méristème. Or, il est nécessaire de connaître l'emplacement des derniers primordia pour pouvoir précisément délimiter le méristème. L'estimation du volume dépend donc ici de ce que l'on observe sur le plan de coupe.
- Le pas de temps de l'échantillonnage est mensuel, on ne sait donc pas à quel stade de son plastochrone le méristème est observé (le pas de temps du plastochrone étant bien inférieur à un mois, cf. partie 1.2.). Comme le volume du méristème varie au cours du plastochrone, des différences faibles de ce volume, observées entre deux échantillons, peuvent en fait correspondre à une même intensité d'activité mais pour des stades différents du plastochrone. Ainsi, seules des grandes différences de volumes d'un échantillon à l'autre pourront témoigner de variations d'intensité d'activité du méristème au cours du temps.

Finalement, l'objectif est de déterminer globalement les périodes pour lesquelles le méristème est le plus actif et celles où il est le moins actif. Ces premières observations permettront de déterminer des fenêtres de temps pendant lesquelles augmenter l'échantillonnage, qui serviront à de futurs protocoles pour étudier l'activité méristématique de manière précise.

Enfin, un indice supplémentaire de l'intensité d'organogenèse entre deux dates d'échantillonnage est suggéré : la densité de chaque type d'axillaire. Cette dernière pourrait témoigner de l'intensité de l'activité méristématique entre deux dates d'échantillonnage, même si elle ne correspond pas à l'instant  $t$  du prélèvement.

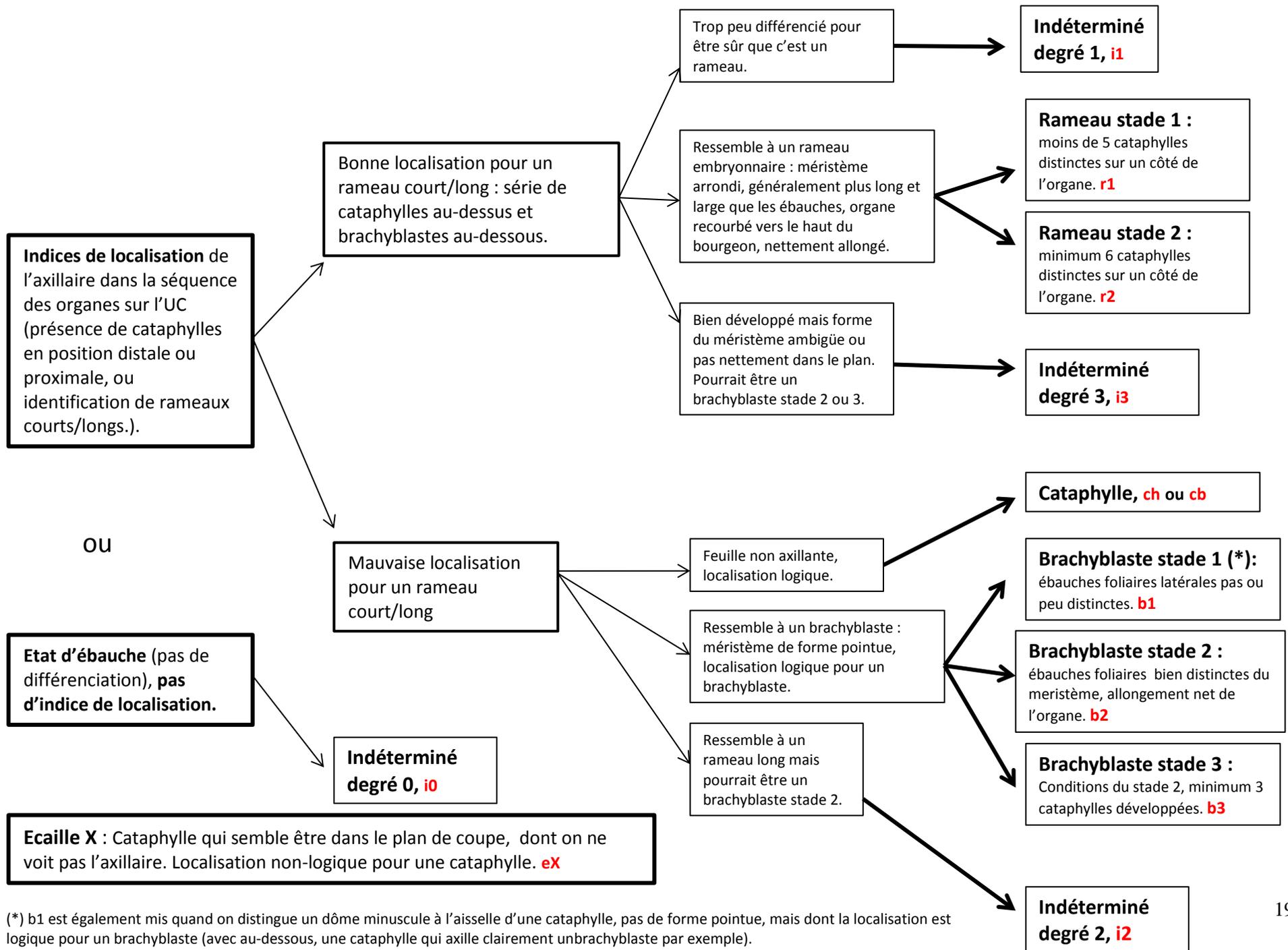


Figure 13 : Typologie des productions axillaires présentes dans le bourgeon apical

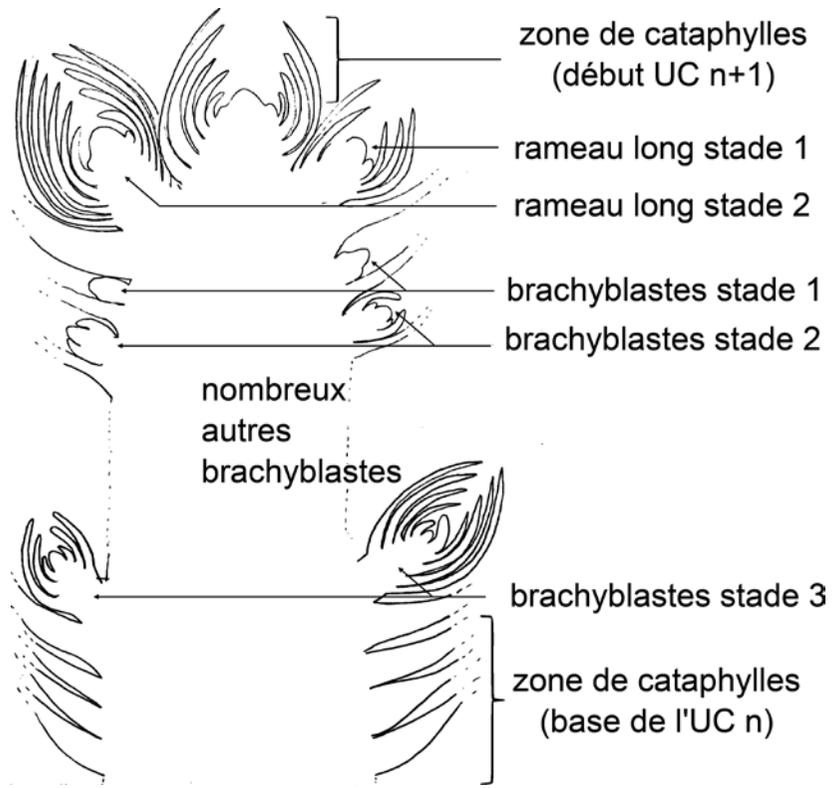


Figure 14 : Stades de différenciation de chaque type d'axillaires

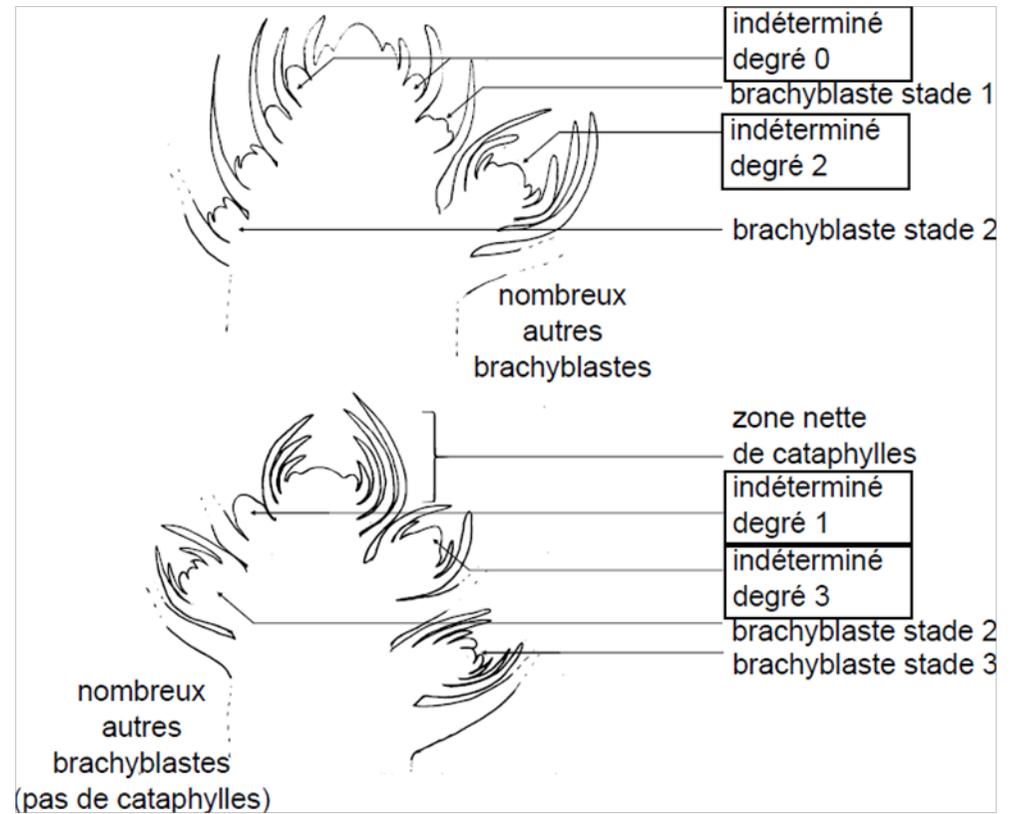


Figure 15 : Stades de différenciation indéterminés

Afin d'estimer les variables décrites en page 18, les données suivantes sont récoltées sur les coupes sélectionnées et photographiées (fig. 16 et 17):

- longueur totale du bourgeon coupé (moyennée sur trois coupes sélectionnées, dont le plan de coupe est distant entre elles au maximum de 25  $\mu\text{m}$ ) ;
- nature et stade de développement des différents axillaires ;
- quantités absolue et relative des types d'axillaires (pointage des axillaires) ;
- distance de chaque axillaire à l'apex et distance entre les axillaires de chaque côté du bourgeon dans l'objectif d'estimer des densités (cf. précisions dans l'annexe 3) ;
- diamètre de la moelle (non analysé).

Mesures pour estimer le volume du méristème :

- L1 : largeur sous les derniers primordia ;
- H1 : projection orthogonale de la pointe de l'apex sur L1 ;
- L2 : largeur au-dessus des derniers primordia ;
- H2 : projection orthogonale de la pointe de l'apex sur L2.

La mesure de ces deux largeurs et deux hauteurs sur le méristème permet de calculer un volume minimal et maximal de méristème. Leur corrélation sera testée par la suite. *A priori*, le volume maximal comporte plus d'informations sur la variabilité du volume au cours du temps que le volume minimal, mais étant donné les enjeux liés au plastochrone, il a paru préférable de prendre deux mesures. La taille minimale et maximale des primordia sous-lesquels a été prise la largeur la plus grande, est indiquée avec des photos, en annexe 3.

#### Conclusion sur les données récoltées en laboratoire :

L'ensemble des étapes menant à la prise de données sur les bourgeons requiert un temps de travail important. A titre indicatif, pour un bourgeon, les durées suivantes sont nécessaires à son analyse :

- Manipulations expérimentales sur les bourgeons (de la fixation à la coupe) : 4 h.  
*N.B. : Durée inférieure aux temps des bains et des périodes de vide puisque d'autres manipulations peuvent être faites en attendant.*
- Sélection des coupes et réalisation des photos et photomontages : 2 h
- Identification des différents types d'axillaires, en passant en revue plusieurs coupes afin de les voir dans des plans de projections différents : 1 à 2 h
- Mesures sur les photos : 1h

Le traitement d'un échantillon, afin de récolter toutes les données nécessaires, prend donc environ huit heures. C'est pourquoi nous avons fait le choix de ne traiter que deux échantillons par date, sur les dix bourgeons récoltés chaque mois.

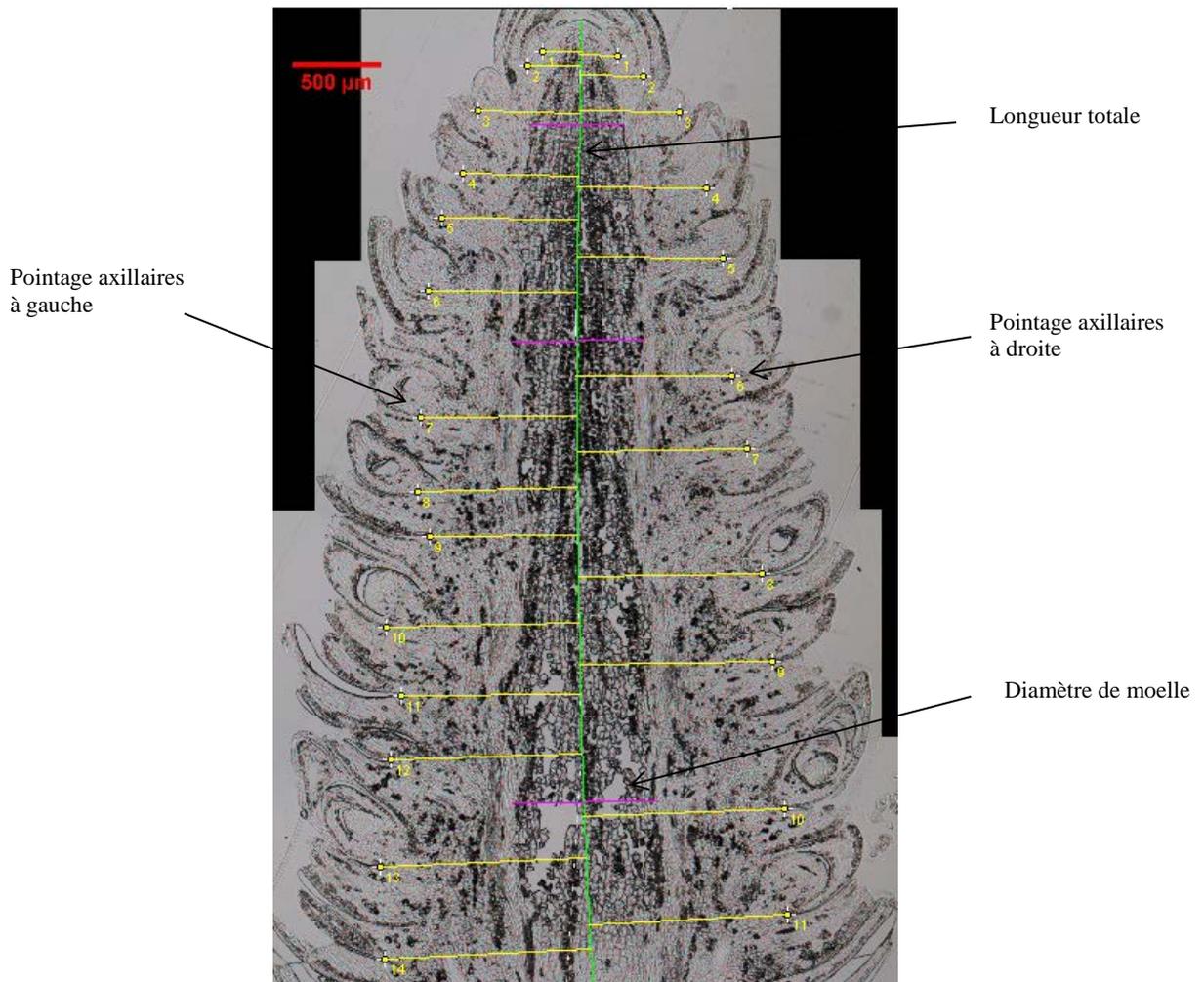


Figure 16 : Mesures sur coupe histologique longitudinale du bourgeon : longueur du bourgeon, position des axillaires et diamètre de la moelle

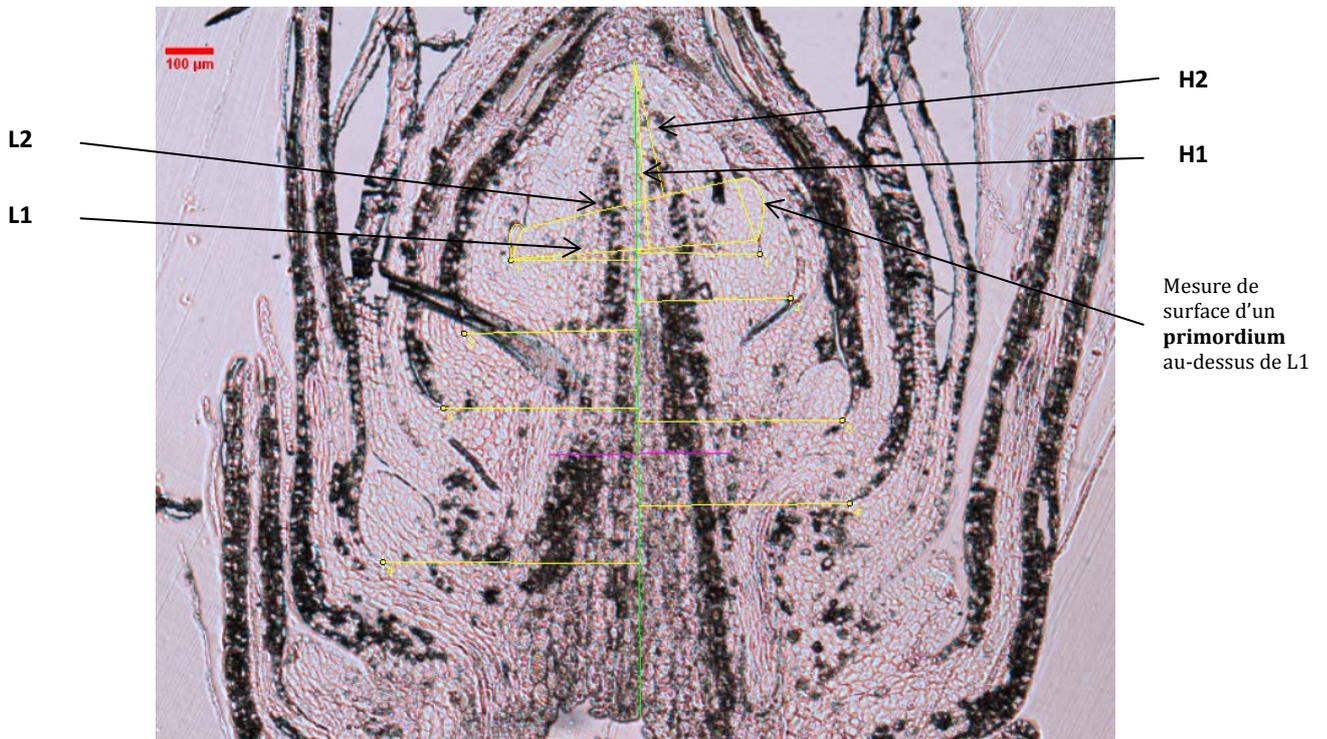


Figure 17 : Mesures sur coupe histologique longitudinale passant par le centre du méristème : Largeurs minimale et maximale (L1 et L2) et hauteurs minimale et maximale (H1 et H2), surface d'un primordium.

### 1.3.3 Données climatiques brutes (Station INRA d'Avignon)

Les données climatiques journalières du 1/10/12 au 30/06/14 de la station météo INRA d'Avignon (située à 5 km du site de Barbentane) ont été récupérées. Elles contiennent les précipitations, la température moyenne, maximale et minimale, et la vitesse moyenne et maximale du vent (en m/sec).

## 1.4 Analyse des données

### 1.4.1 Variables indicatrices de l'évolution de l'allongement au cours du temps

#### 1.4.1.1 Dynamiques d'allongement des unités de croissances pour chaque individu suivi

Le suivi d'allongement est traité sous format MTG dans le logiciel gnu-R (R Development Core Team, 2010), afin de représenter par individu suivi sur le terrain :

- les courbes d'allongement de chaque unité de croissance de la pousse annuelle en fonction des jours juliens (du 19 mars 2013 au 24 avril 2014) ;
- l'accroissement au cours du temps de chaque unité de croissance et de la PA. Cette donnée représente une intensité d'allongement, en millimètres allongés par jour.

Pour calculer une intensité de l'allongement de chaque UC au cours du temps (l'accroissement entre deux dates de relevé  $i$ ), la formule suivante est utilisée sur les données du fichier MTG pour chaque UC :

$$Acc(i, t) = \left( \frac{Lg(i, t) - Lg(i, t - 1)}{date(t) - date(t - 1)} + \frac{Lg(i, t + 1) - Lg(i, t)}{date(t + 1) - date(t)} \right) / 2$$

$i$  : individu suivi tous les mois

$t$  : date de relevé

$Lg(i, t)$  : longueur de l'individu  $i$  à la date  $t$ , en mm

$date(t)$  : jour julien de la mesure  $t$

Cette opération donne une valeur estimée de l'accroissement, en millimètres par jour.

#### 1.4.1.2 Synthèse des observations en fonction du taux de polycyclisme de la pousse annuelle.

Deux « profils » d'allongement et d'accroissement des UC au cours du temps sont établis selon le taux de polycyclisme des individus : une pousse annuelle tricyclique et une pousse annuelle tetracyclique. Les moyennes sont ensuite calculées sur l'ensemble des mesures (pour chaque date) des individus inclus dans une catégorie.

### 1.4.2 Variables indicatrices de l'évolution de l'organogenèse au cours du temps.

#### 1.4.2.1 Données calculées

Plusieurs variables synthétiques ont été calculées dans l'objectif d'étudier les principales variations d'intensité d'organogenèse au cours du temps :

➤ Deux indicateurs du volume du méristème (fig. 17):

- $Volume\ max = L1^2 \times H1$
- $Volume\ min = L2^2 \times H2$

Ces indicateurs sont construits sur l'hypothèse que la forme du méristème est proche de celle d'un cône. Comme le volume d'un cône se calcule par la formule  $[\pi \times r^2 \times h/3]$  (avec r le rayon et h la hauteur du cône),  $[r^2 \times h]$  est proportionnel au volume du cône.

➤ Des indicateurs de l'activité récente d'organogenèse d'une date à l'autre :

- Densité totale d'axillaires sur le bourgeon entier (fig. 16) :

$$D_{tot} = \frac{n_d + n_g}{L}$$

$n_d$  : nombre d'axillaires pointés sur la droite de la coupe

$n_g$  : nombre d'axillaires pointés sur la gauche de la coupe

L : longueur totale (en mm)

- Densité par type d'axillaire sur le bourgeon entier (nombre d'axillaire par millimètre, fig. 16) :

$n_{d\ ax(i)}$  : nombre d'axillaires de type i pointés sur la droite de la coupe

$$D_{ax(i)} = \frac{n_{d,ax(i)} + n_{g,ax(i)}}{da_{ax(i),distal} - da_{ax(i),proximal}}$$

$n_{g\ ax(i)}$  : nombre d'axillaires de type i pointés sur la gauche de la coupe

$da_{ax(i)\ distal}$  : distance à l'apex de l'axillaire de type i le plus distant de cet apex (qu'il soit à droite ou à gauche).

$da_{ax(i)\ proximal}$  : distance à l'apex de l'axillaire de type i le plus proche de cet apex (qu'il soit à droite ou à gauche).

*N.B. : Attention, ce qui est appelé « densité » est en fait toujours un indicateur de la densité réelle des axillaires du bourgeon. La densité calculée sur les coupes ne prend en compte que les axillaires correctement observables et identifiables sur le plan de coupe, elle n'estime donc pas l'ensemble des pièces latérales disposées autour de l'axe selon une phyllotaxie alterne-spiralée. La donnée « densité totale » a été calculée sur trois coupes distantes de 5 à 25  $\mu$ m, elle est ensuite moyennée et les écart-types de mesures entre les coupes sont représentés sur des histogrammes par des barres d'erreur. La densité par type d'axillaire (et non totale) a elle été estimée sur une seule coupe par bourgeon. Ces données sont donc à considérer comparativement entre les échantillons.*

Les types d'axillaires des catégories « indéterminé » et « rameau » (cf. typologie décrite dans la partie 1.3.2.2, figures 13, 14 et 15) ont été regroupés avec différents stades de maturité des brachyblastes. En effet, il est inutile de calculer une densité lorsqu'il n'y a qu'un ou deux axillaires d'un certain type. Par exemple, les rameaux sont toujours disposés sur un pseudoverticille (au même niveau sur l'axe). Les types r1, r2, i1, i2 et i3 de la typologie sont donc regroupés avec les brachyblastes qui se trouvent au-dessous. Cela donne des catégories telles que « b2 i1/i2 » ou encore « b2 r1 ». La densité pour ces catégories est donc estimée sur la longueur qu'occupe l'ensemble de ces pièces.

La densité déclinée par type d'axillaire est importante à calculer car les axillaires occupent un espace très variable dans le bourgeon selon leur catégorie et leur stade de maturité. Il était nécessaire, pour comparer les échantillons de différentes dates, que la densité soit rattachée à un type d'axillaire.

- Estimation de l'intensité d'allongement des UC sous-jacentes au bourgeon :

Cette dernière variable d'accroissement sert à évaluer l'effet de la compétition de l'allongement sur l'organogénèse. Elle est calculée grâce à une méthode comparative entre les individus sur lesquels est fait le suivi d'organogénèse et ceux suivis en allongement.

Une matrice est construite, avec en ligne les individus dont on a prélevé les bourgeons, et en colonne des informations sur les pousses annuelles de 2013, 2012 et 2011 de ces mêmes individus. Ces informations sont, pour chaque PA : la longueur de chaque UC, le taux de polycyclisme et la longueur totale de la PA (au moment de la date d'échantillonnage pour la PA en cours d'allongement). Les dimensions de cette matrice sont donc finalement de 26 lignes (nombre de bourgeons analysés) et 19 colonnes (nombre de variables concernant les UC et les PA). Une portion de la matrice pour un bourgeon est prise en exemple, annexe 5.

Le vecteur-ligne de chaque bourgeon est comparé aux données équivalentes pour les 40 individus dont l'allongement a été suivi dynamiquement, à la date correspondant au prélèvement du bourgeon. Grâce à un calcul de distance euclidienne (à 19 dimensions), un individu suivi en allongement est rattaché à un individu dont on a prélevé le bourgeon (celui pour lequel la distance est la plus petite). Précédemment au calcul de distance euclidienne, chaque colonne est centrée et réduite afin de leur donner à toutes le même poids dans le calcul de distance. Ce calcul de distance permet d'attribuer à chaque bourgeon, une estimation de l'accroissement de la portion de pousse annuelle qui lui est sous-jacente (voir l'exemple annexe 5).

$$\text{Distance euclidienne entre le bourgeon } b \text{ et l'individu } i = \sqrt{\sum_{v=1}^{19} (X_{v,b} - X_{v,i,t(b)})^2}$$

$X_{v,b}$  : variable  $v$  pour le bourgeon  $b$

$X_{v,i,t(b)}$  : variable  $v$  pour l'individu  $i$  à la date  $t(b)$  (date de prélèvement du bourgeon  $b$ )

#### 1.4.2.2 Analyses statistiques et graphiques pour étudier les facteurs influençant le volume du méristème.

##### ACP

Une ACP normée est réalisée afin d'étudier les liens entre les indicateurs du volume de méristème de chaque individu et les variables suivantes (tableau d'entrée de l'ACP en annexe 7):

- Volume max (cf. partie 1.4.2.1, p.24) : 'VolMax'
- Volume min : 'Volmin'
- Longueur totale du bourgeon : 'LgTot'
- Densité totale des axillaires sur toute la longueur du bourgeon : 'DensTot'
- Densité totale de pièce dans la zone proche du méristème (sur une distance de 1360  $\mu\text{m}$  depuis l'apex) (cf. figure 17, p.22) : 'DensSom'
- Densité de chaque type d'axillaires sur toute la longueur le bourgeon : 'DensCb', 'DensB3', 'DensB2', 'Dens B1', 'Dens B1I1', 'DensB2I1I2', 'DensB2R1', 'DensB2R2', 'DensB3I3R1'.

- Axillaires observés juste en dessous du méristème : 'Axil', codé en quatre catégories : 0 = premières cataphylles, 1 = cataphylles avancées, 2 = petits brachyblastes au stade 1, 3 = grands brachyblastes au stade 1.
- Numéro de l'UC en cours de formation : 'NUCCorr' (Corr pour « corrigé », c'est la numérotation de l'UC incluant les hypothèses d'appartenance à la pousse annuelle de l'année suivante. Par exemple, si la pousse 2013 est estimée comme tricyclique, la quatrième UC décrite sera NUCCorr=1 car la première de 2014).
- Numéro de l'UC sous-jacente au bourgeon : 'UCPrec'
- Longueur de l'UC sous-jacente : 'LgPrec'
- Nombre de rameaux ou bourgeons de l'UC sous-jacente : 'NRamPrec'
- Nombre de cônes de l'UC sous-jacente : 'NConePrec'
- Accroissement de l'UC sous-jacente : 'Acc'

#### Remarques :

- La variable 'Axil' est étudiée dans le but de savoir si le volume méristématique, à l'instant t auquel le bourgeon a été plongé dans le fixateur, est relié au type d'organe en cours de formation. Il est donc intéressant de savoir quel type d'axillaire est situé juste en-dessous du méristème et a donc probablement été formé peu avant la fixation.
- Les variables relatives à la densité des différents axillaires dans l'ensemble du bourgeon ont été choisies plutôt que les simples quantités d'axillaires pour deux raisons :
  - La densité d'axillaires est une variable plus précise que la quantité car elle s'abstrait des variations de taille du bourgeon ou du fait qu'on n'observe parfois que l'extrémité de l'UC dans le bourgeon.
  - C'est également une variable plus synthétique car elle fusionne des catégories d'axillaires en maintenant clairement l'information début/milieu/fin d'UC.

Il est important de souligner que cette ACP se fait avec peu d'observations (les 26 bourgeons coupés). Des régressions linéaires, ainsi que des ANOVA et des représentations graphiques, vont permettre d'affiner l'étude des corrélations entre les variables explicatives et la variable à expliquer (volume du méristème).

#### Analyses pour les variables discrètes

Les variables 'Axil' et 'NUCCorr' étant des variables discrètes, des ANOVA (ANalysis Of VAriance) sont réalisées afin d'étudier les variations du volume du méristème sur les différentes catégories de chacune des variables. De plus, des boîtes à moustaches ont été dessinées pour étudier ces mêmes relations, avec le premier, le second (médiane) et le troisième quartile délimitant la boîte. Les extrema du volume méristématique dans chaque catégorie constituent les moustaches.

#### Régression linéaire

La première régression linéaire effectuée est celle du volume maximal en fonction du volume minimal, afin de vérifier que ces deux variables soient bien fortement corrélées et de n'utiliser que le volume maximal comme variable à expliquer.

Ensuite, une régression linéaire est réalisée sur les données susceptibles d'être corrélées à la taille du méristème selon les résultats de l'ACP. Les variables de la régression sont les suivantes (voir au-dessus pour le nom complet des variables) :

- 'NUCCorr' et 'NUCCorr Factor' (le 'Factor' est utilisée pour les variables discrètes)
- 'DensTot'
- 'DensCB', 'DensB1', 'DensB2' et 'DensB2I1I2'

- 'Axil' et 'AxilFactor'
- 'Acc'

Toutes les combinaisons possibles de ces variables sont testées, avec une somme de type III (qui rend la régression insensible à l'ordre des variables dans l'écriture de la formule, ce qui est le cas avec des sommes de type I) et une limitation à quatre variables par équation.

### 1.4.3 Indices calculés sur les données climatiques

Le climat est ici étudié de manière très globale. L'objectif est surtout de savoir si, sur la période de suivi, le climat fut typique d'un climat méditerranéen et si des épisodes de stress ont eu lieu (tels que de fortes sécheresses ou des gelées).

Les données climatiques ont été récupérées de la station météo de Montfavet (INRA Avignon), plusieurs indices en sont déduits :

- o Indice mensuel d'aridité De Martone :

$$I = 12 * P / (T + 10)$$

P : pluies mensuelles en mm

T : température moyenne mensuelle en °C

- o Indice journalier d'aridité De Martone (car les mensuels sont peu précis vis-à-vis de la date de récolte) :

$$I = 12 * P_{\text{des 29 jours précédents et du jour concerné}} / (T_{\text{des 29 jours précédents et du jour concerné}} + 10)$$

- o Nombre de jours de gelée par mois.
- o Données nécessaires au diagramme ombrothermique :
  - température moyenne mensuel ;
  - température minimale moyenne mensuelle ;
  - température minimale sur le mois ;
  - température maximale moyenne sur le mois ;
  - température maximale sur le mois ;
  - pluviométrie mensuelle (mm/mois).

Diagramme ombrothermique et nombre de jours de gelées seront comparés aux moyennes sur 1997-2011 de la station MétéoFrance d'Aix-en-Provence (à latitude et altitude comparables et avec le même contexte méditerranéen que le site de Barbentane), afin d'attester du caractère plus ou moins méditerranéen de l'année mars 2013 à mars 2014.

## **2 Résultats : chronologie des processus de croissance de la pousse annuelle.**

Cette partie présente l'ensemble des résultats obtenus par les méthodes exposées dans la partie précédente. Les résultats sont synthétisés sous différentes formes, de manière à pouvoir les interpréter comme des pièces constitutives de la chronologie que nous souhaitons établir de la croissance.

L'interprétation s'organise en deux parties : les différentes périodes de la croissance, puis les variations d'intensité de cette croissance au cours du temps (à l'intérieur des périodes actives).

### **2.1 Les différentes périodes de l'organogenèse et de l'allongement de la pousse annuelle 2013 (et début de celle de 2014)**

Dans cette sous-partie, allongement et organogenèse seront traités séparément, puis regroupés et comparés sous forme d'un schéma bilan.

#### **2.1.1 Périodes d'allongement des unités de croissance successives**

##### **2.1.1.1 Dynamiques d'allongement par individu**

Seuls les seize individus qui ont pu être suivis de mars 2013 à avril 2014 sont représentés sur la figure 18. De nombreuses morts d'apex ont eu lieu en automne 2013, et au printemps 2014, possiblement dues à des attaques de « Tordeuse du Pin » (Lepidoptère). La totalité des individus suivis au départ est présentée en annexe 8.

En annexe, les individus sont séparés selon qu'ils soient situés dans des peuplements denses ou des peuplements clairs – car la compétition est susceptible d'influencer l'allongement des pousses – mais aucune différence notable n'ayant été mise en évidence, il n'a pas semblé utile d'analyser séparément les peuplements dans cette partie.

Globalement, on peut faire les remarques suivantes :

- Les UC 1 et 2 s'allongent simultanément sur les mois de mars, avril et mai (de rares cas de prolongement sur les mois de juin et juillet sont observés dans l'annexe 8 et pour l'individu P7N3). Le pic d'accroissement de l'UC 1 se fait sur avril-mai.
- L'UC 2 peut continuer à s'allonger jusqu'en juillet (de rares cas d'allongement jusqu'en septembre sont observés en annexe 8). Le pic d'accroissement de l'UC 2 se fait sur mai-juin.
- L'UC 3 démarre généralement son allongement en juin (elle peut donc s'allonger simultanément à l'UC 2) et s'allonge en général jusque début août. Sa phénologie est cependant assez variable, on observe des cas de début d'allongement en avril ou de fin d'allongement en octobre. Son pic d'accroissement se situe en revanche toujours sur juin-juillet.
- L'UC 4 n'est pas toujours présente, si c'est le cas, elle s'allonge en général sur juillet-août-septembre (et de rares cas, en annexe 8, montrent un démarrage en mai ou une fin en novembre). Son pic d'accroissement est en août.

En général la hiérarchie des tailles finales des unités de croissance d'une pousse annuelle est la suivante : UC2>UC1>UC3>UC4. Le taux de polycyclisme est au minimum de trois UC et au maximum de quatre UC.

Deux individus se démarquent nettement des autres : P8N4 et P7N3, pour lesquels l'UC2 est plus petite que l'UC1. Ces individus ne portent par ailleurs aucun cône. Il est rare sur le site, que l'UC 1 ne porte pas de cône femelle sur son pseudoverticille, mais c'est également le cas des individus P5N3 et P9N1, dont l'UC 2 est bien plus grande que l'UC 1.

Finalement, la pousse annuelle s'allonge de mars à novembre, avec un pic d'intensité d'allongement sur mai-juin (en même temps que celui de l'UC2) et un arrêt complet en novembre de l'année n, jusqu'à février de l'année n+1.

Cependant, une nuance importante est à ajouter à cette conclusion : grâce aux dates de suivi de mars et avril 2014, on a pu mettre en évidence que dans la majorité des cas (10 sur 16), l'UC notée soit UC4, soit UC5 selon les individus, est en fait l'UC 1 de l'année 2014 qui réalise une très courte première phase d'allongement avant un arrêt complet de novembre 2013 à février 2014 et reprend son allongement de manière beaucoup plus intense à partir de mars 2014.

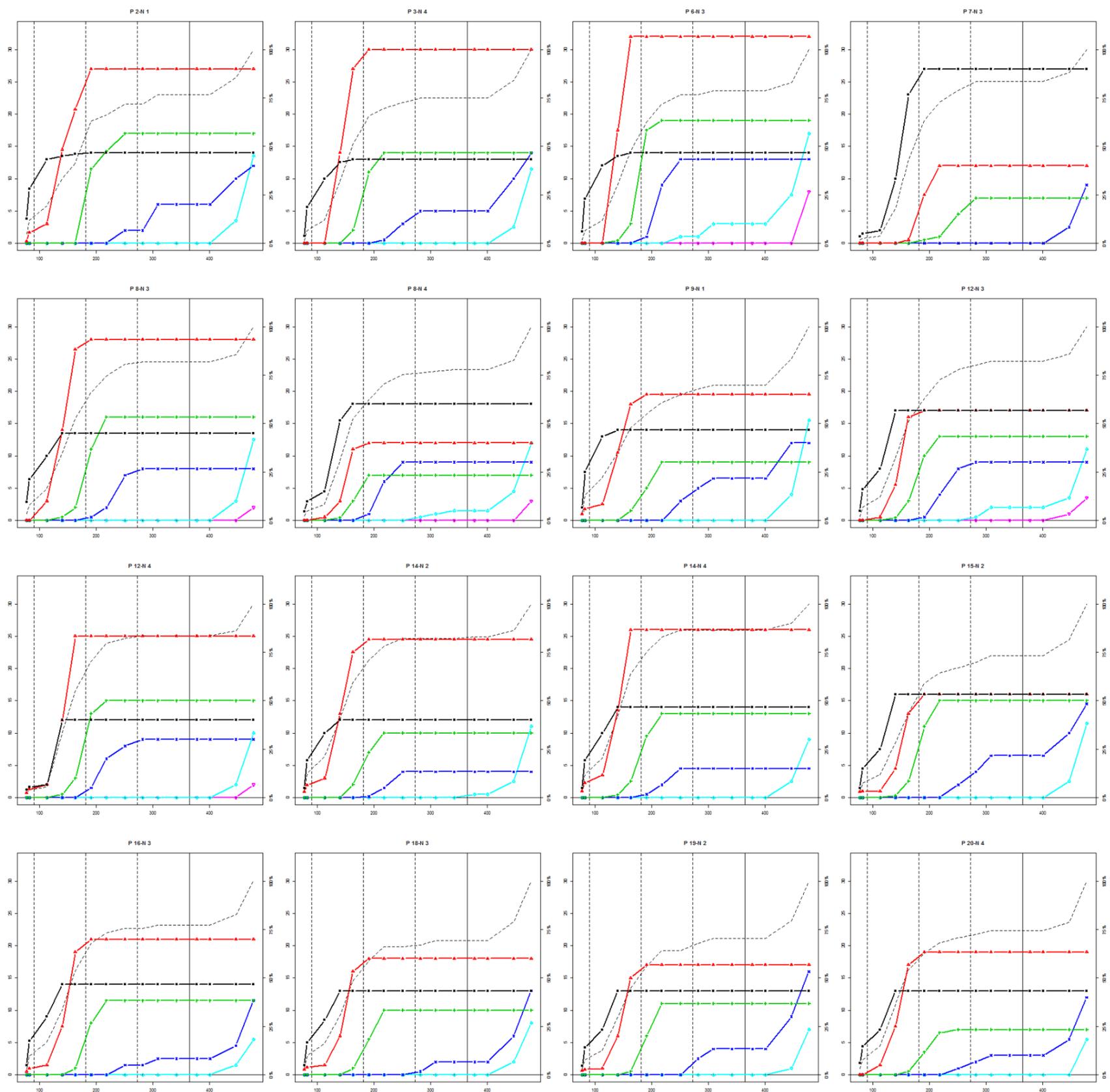
Pour détailler cette observation, sur les 16 individus dont la même pousse a pu être suivie de mars 2013 à avril 2014, on observe six cas où l'UC1 2014 a commencé son allongement dès septembre de l'année 2013 (P20-N4, P3N4, P9N1, P16N2, P2N1, P6N3), et quatre cas où l'UC1 2014 a commencé son allongement en octobre-novembre 2013 (P12N3, P18N3, P19N2, P8N4). Il semblerait que dans le cas où l'UC 1 2014 commence à s'allonger dès septembre 2013, la pousse annuelle 2013 est en général tricyclique tandis que dans le cas où l'UC 1 2014 commence son allongement en novembre, le taux de polycyclisme de la pousse 2013 est plus variable.

**Bilan :** La PA d'une année (n) peut commencer à s'allonger de quelques centimètres à l'automne de l'année (n-1). Après une pause entre novembre de l'année (n-1) et février de l'année (n), l'allongement s'étend de mars à novembre avec un pic d'activité en mai-juin. Les UC 1 et 2 s'allongent simultanément au début du printemps. La pousse annuelle est soit tricyclique, soit tetracyclique et les dernières UC s'allongent à la fin du printemps et pendant l'été.

Il est tout de même important de souligner que les tendances générales dégagées ci-dessus, sont à nuancer par la variabilité inter-individuelle que l'on observe (notamment avec l'annexe 8 qui représente la totalité des individus suivis) sur les critères suivants :

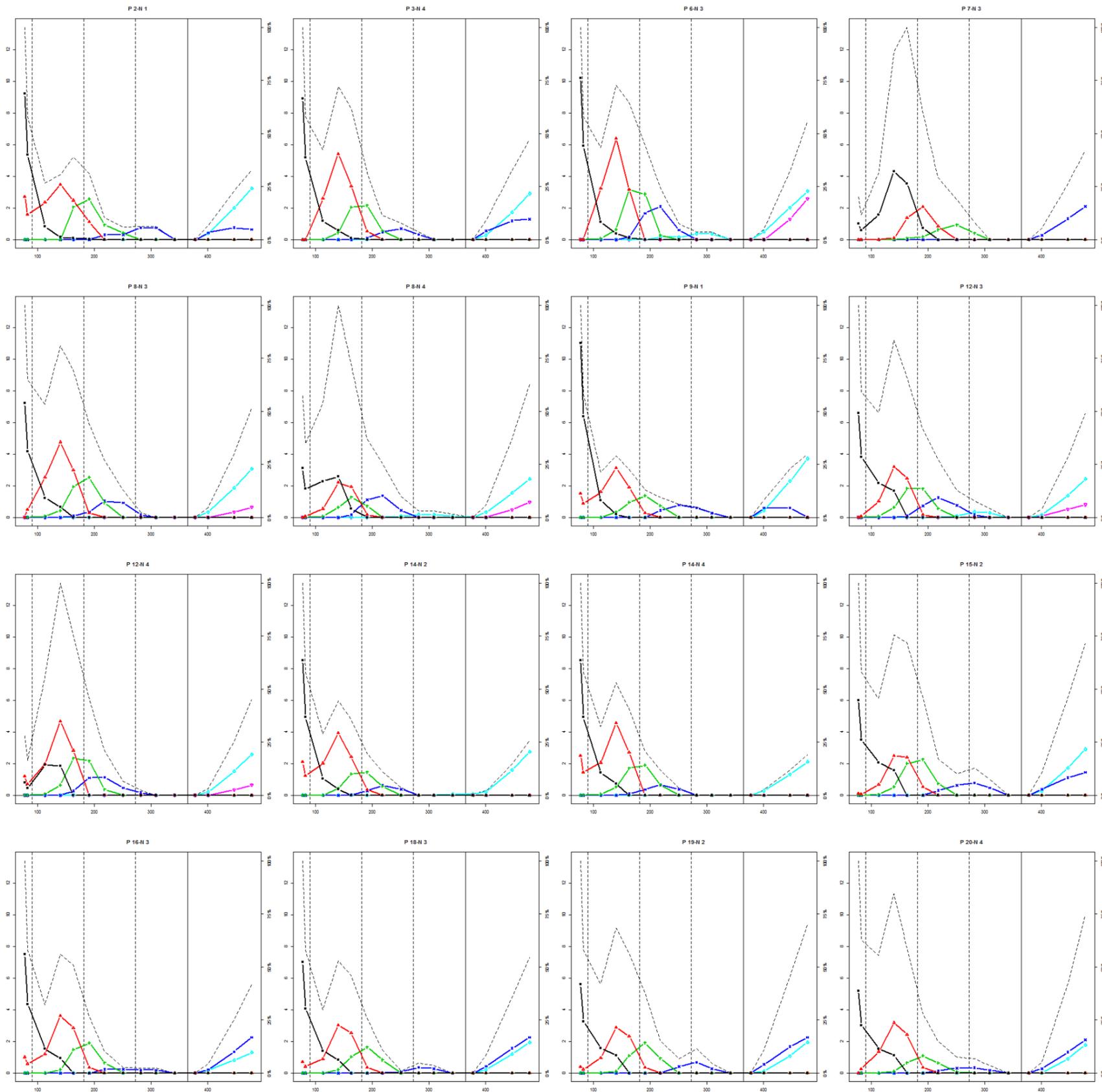
- la taille de chaque UC et les rapports de taille qui les relient ;
- la phénologie de chaque UC (variabilité jusqu'à deux mois de décalage) ;
- le moment où l'UC 1 de la pousse annuelle de l'année suivante commence à s'allonger (en automne de cette même année ou au printemps suivant).

Malgré cette variabilité inter-individuelle, au vu des résultats du suivi d'allongement, il nous a paru intéressant de les synthétiser à travers deux profils de dynamique d'allongement de la pousse annuelle 2013 (et début de la PA 2014), distingué par le taux de polycyclisme.



- Chaque individu suivi est identifié au-dessus des graphes par son numéro de plot (P...) et un numéro propre à l'arbre au sein du plot (N...).  
Exemple : P10N2 est l'individu 2 du plot 10 (cf. partie 1.1 et 1.3.1).
- Chaque couleur de courbe correspond à une unité de croissance, numérotée selon son ordre d'apparition (pas de réinitialisation de la numérotation avec le début d'allongement de la pousse annuelle 2014) :
  - UC 1 = noire
  - UC 2 = rouge
  - UC 3 = verte
  - UC 4 = bleue foncée (peut être UC 1 de l'année n+1)
  - UC 5 = bleue claire (peut être l'UC 1 ou 2 de l'année n+1)
  - UC 6 = rose (UC 2 de l'année n+1).
- La courbe en pointillés correspond à l'allongement relatif (en pourcentage de la longueur maximale) de la pousse annuelle au cours du temps.
- Ce code couleur des UC sera maintenu dans la présentation des résultats tout au long du rapport.

Figure 18 : Allongement (cm) des unités de croissance en fonction de leur rang sur la pousse annuelle, de mars 2013 à avril 2014



- Le code couleur est le même que pour la figure précédente.
- Le calcul d'accroissement s'approche de la dérivée des courbes d'allongement. C'est une estimation de l'intensité de l'allongement.
- Ce calcul fait une moyenne, par date (chaque point marqué de la courbe), entre le nombre de millimètres gagnés par l'unité de croissance depuis la dernière date d'échantillonnage, avec le nombre de millimètre que l'UC a en moins par rapport à la date suivante. Le temps écoulé entre deux dates d'échantillonnage est compté en jours juliens. L'accroissement s'exprime donc en millimètres par jour.
- La courbe en pointillés correspond à l'accroissement relatif (en pourcentage de l'accroissement maximal) de la pousse annuelle au cours du temps.

Figure 19 : Accroissement (mm/jour) des unités de croissance en fonction de leur rang sur la pousse annuelle de Mars 2013 à Avril 2014

### 2.1.1.2 Dynamique moyenne de l'allongement des unités de croissance des pousses annuelles selon le taux de polycyclisme.

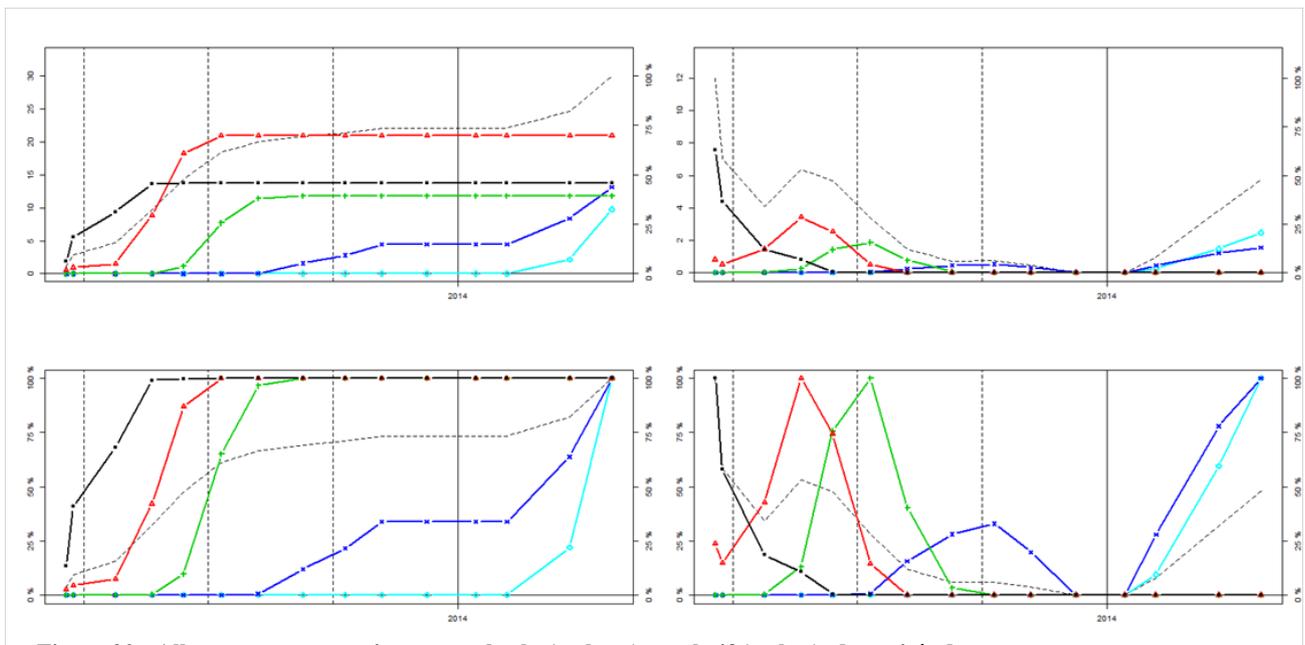
Les figures 20 et 21 présentent les deux modèles qui ont été établis par la méthode décrite dans le paragraphe 1.4.1.2. Sont représentés pour chaque profil, les mêmes types de courbes que celles des graphiques individuels et s'y ajoutent au-dessous, les graphiques de l'allongement relatif (pourcentage de la longueur finale) et de l'accroissement relatif (pourcentage de l'accroissement maximal) de chaque unité de croissance, et non plus seulement de la pousse annuelle.

Le profil 1 (fig.20) correspond à une PA tricyclique. Il moyenne les mesures des huit individus suivants : P15N2, P16N3, P2N1, P18N3, P19N2, P20N4, P3N4, P9N1 (présentés dans les figures 18 et 19). Le profil 2 (fig.21) correspond à une PA tetracyclique, il moyenne les mesures des six individus suivants : P14N2, P14N4, P8N3, P12N3, P12N4, P6N3 (fig. 18 et 19). Les individus P8N4 et P7N3 ont été écartés des profils car la taille inhabituelle de leurs UC 1 et 2 fausserait les moyennes.

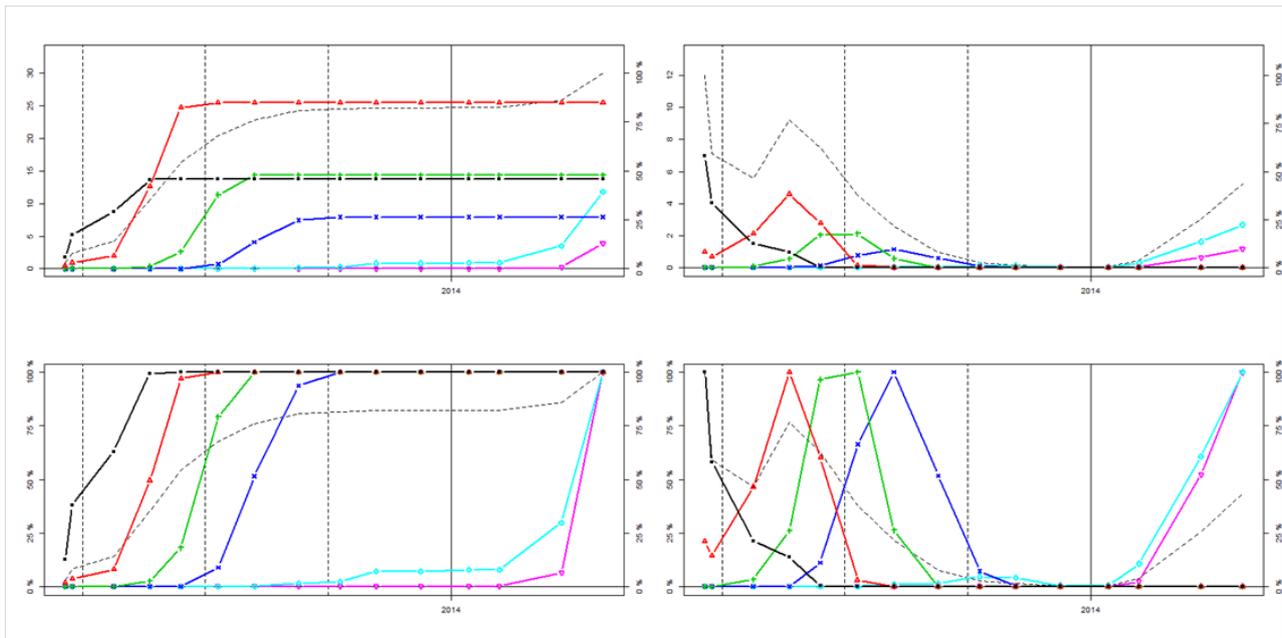
Pour les pousses annuelles tricycliques en 2013, la courbe bleue foncée représente l'UC 1 de la pousse annuelle 2014 et la courbe bleue claire son UC 2. Pour le profil tetracyclique, la courbe bleue foncée représente son UC 4, la bleue claire l'UC 1 de la pousse de 2014 et la rose l'UC 2. On remarque que sur le profil tricyclique, l'UC 1 de la pousse annuelle 2014 réalise un allongement précoce de quelques centimètres pendant l'automne 2013. Ce n'est pas le cas du profil avec une PA 2013 tetracyclique, dans lequel l'UC 1 de 2014 commence le plus souvent son allongement au printemps de l'année 2014 (après vérification sur les individus qui constituent les moyennes). Concernant la chronologie et le taux d'accroissement des autres unités de croissance au cours de l'année 2013, ils semblent en revanche similaires pour les deux profils.

Finalement, le fait qu'une quatrième UC se développe ou non, pourrait donc avoir une influence sur la chronologie d'allongement de la première UC de la pousse annuelle suivante.

*N.B. : Un schéma bilan résume ces observations dans la partie 2.1.3.*



**Figure 20 : Allongement et accroissement, absolu (en haut) et relatif (en bas), des unités de croissance successives d'une pousse annuelle tricyclique**



**Figure 21 : Allongement et accroissement, absolu (en haut) et relatif (en bas), des unités de croissance successives d'une pousse annuelle tetracyclique**

A présent que les périodes d'allongement de chaque unité de croissance ont été définies, intéressons-nous à leurs périodes d'organogenèse.

### 2.1.2 Périodes de l'organogenèse des unités de croissance successives

Pour rappel : en raison du temps que requiert le traitement complet d'un bourgeon et la prise de données et de mesures sur chacun (environ 8 heures par bourgeon), seuls deux bourgeons sur les dix prélevés par date d'échantillonnage ont été analysés.

#### 2.1.2.1 Identification de l'UC en cours d'organogenèse dans les bourgeons prélevés.

L'analyse rétrospective des pousses sous-jacentes aux bourgeons prélevés, sur chaque individu de chaque échantillonnage (soit 26 individus différents, avec deux individus analysés par date et treize dates au total), est représentée sur la figure 22. Le code couleur des UC est le même que pour le suivi de l'allongement. L'UC en cours d'organogenèse a pu être identifiée grâce à cette analyse rétrospective et à sa confrontation avec les dynamiques d'allongement de chaque UC, qui permettent d'en connaître la phénologie. L'identification est représentée sur la figure ci-dessus par la couleur donnée au bourgeon apical de chaque individu.

Le calcul des distances euclidiennes, qui rattache à chaque individu dont on a prélevé le bourgeon, un individu suivi en l'allongement (cf. partie 1.4.2.1, p.25), confirme *a priori* l'identification de l'UC en cours d'organogenèse dans le bourgeon apical. Un doute persiste cependant sur le bourgeon du mois de juillet qui pourrait être soit l'UC 4, si l'individu est tetracyclique, soit l'UC 1, si l'individu est tricyclique.

*N.B. : Rappelons que, bien que les résultats soient lus comme une chronologie, chaque individu est différent d'une date à l'autre et entre les deux répétitions d'échantillonnage. La variabilité inter-individuelle peut donc parfois gêner la lecture d'une chronologie.*

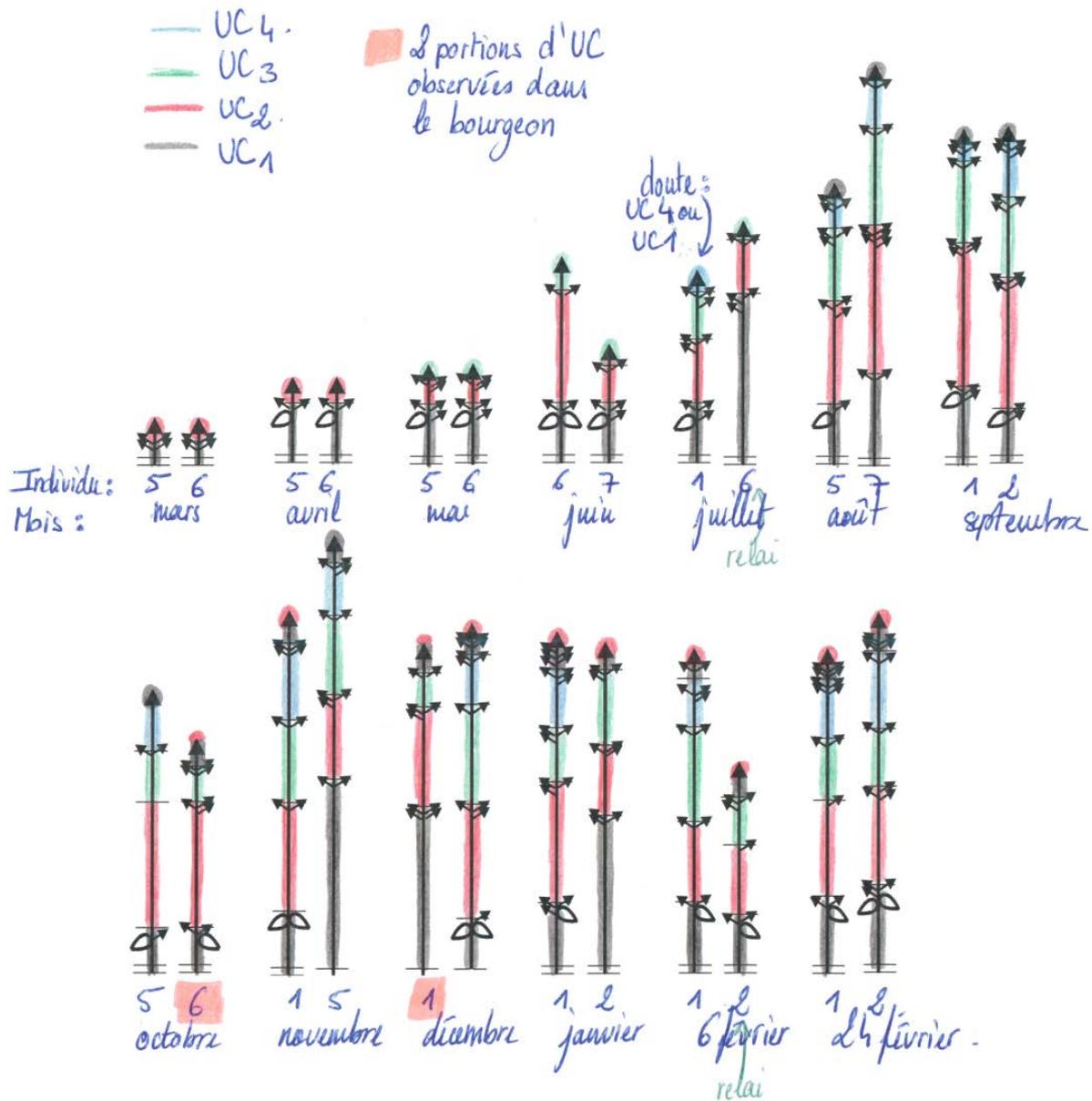


Figure 22 : Identification de l'unité de croissance en cours d'organogénèse dans le bourgeon par l'analyse rétrospective de la croissance de la pousse sous-jacente

On constate que dès le mois de mars c'est l'UC 2 qui est en cours de formation dans le bourgeon. L'UC 3 est créée pendant les mois de mai, juin voire juillet et l'UC 4 n'apparaît que pour un individu en juillet (*a priori*). L'UC 1 de la pousse annuelle de l'année suivante commence à être présente dans le bourgeon dès le mois d'août et son organogénèse peut continuer jusqu'en novembre. L'UC 2 de la pousse annuelle de l'année suivante peut visiblement commencer à être créée dès le mois d'octobre et reste observable dans le bourgeon pendant tout l'hiver.

Seuls deux échantillons comportent des portions de l'UC 1 et 2 simultanément présentes dans le bourgeon : octobre n°6 et décembre n°1. L'hypothèse des UC 1 et 2 entièrement préformées dans le bourgeon l'année avant leur allongement n'est donc ici qu'à moitié vérifiée puisque les deux UC ne sont jamais observées dans leur intégralité au sein du même bourgeon. L'UC 1 est visiblement, la plupart du temps, déjà allongée de 2 ou 3 cm sous le bourgeon qui contient alors l'UC 2 à un stade d'organogénèse plus ou moins avancé (on retrouve les constats faits sur les résultats du suivi d'allongement).

De manière générale, ces premiers résultats nous apportent la certitude que chez le Pin d'Alep, une UC, ou une partie d'UC, est toujours préformée dans le bourgeon puisque de nombreux organes embryonnaires sont toujours visibles dans le bourgeon.

Il est intéressant d'observer que l'individu « octobre 6 », dont la pousse annuelle est tricyclique, commence à préformer l'UC 2 dès le mois d'octobre. Ce n'est pas le cas de l'individu « octobre 5 » dont la PA est tetracyclique. Cependant, cette observation n'est pas confirmée par l'individu « décembre 1 » qui a également une PA 2013 tricyclique mais qui commence la préformation de l'UC 2 seulement en décembre. Les individus de novembre présentent également des résultats divergents. On ne peut donc pas raisonnablement faire d'hypothèse sur le fait que la croissance d'une quatrième UC sur la PA 2013 ait une influence sur l'organogenèse des UC 1 et 2 de la pousse annuelle 2014 (ce qui aurait pu venir étayer les observations du suivi d'allongement, p.32).

*N.B. 1 : Pour les individus « octobre 6 » et « novembre 1 », il manque des données dans le MTG pour être sûr des observations. Les distances euclidiennes ont cependant confirmées le choix final.*

*N.B. 2 : « juillet 6 », « 6 février 2 » et « 24 février 2 » sont des relais.*

La prochaine étape est de qualifier le stade d'avancement de l'organogenèse de l'UC observée dans chaque bourgeon, afin de préciser la chronologie de l'organogenèse de chacune des UC.

#### 2.1.2.2 Détermination du stade d'avancement de l'organogenèse de(s) l'UC présente(s) dans les bourgeons.

L'histogramme de la figure 23 a été réalisé à l'aide de la typologie présentée dans la partie 1.3.2.2. Les résultats d'identification avec cette typologie (fig. 13, 14, 15 – p. 19-20, et annexe 6) sont les suivants :

Type	Cataphylles	Brachyblastes	Rameaux courts/longs	Indéterminés 1, (2) et 3	Indéterminé 0
%	31 %	54 %	1 %	4 %	10 %

Si on assimile les indéterminés 1, 2 et 3 à des rameaux courts ou longs, il y aurait 5 % des axillaires qui seraient des rameaux, ce qui semble raisonnable au vu de ce que l'on peut voir à un stade développé sur les pousses allongées.

L'histogramme de la figure 23 présente les pourcentages de chaque type d'axillaire sur la totalité des axillaires identifiés pour chaque bourgeon. Les pourcentages sont superposés dans les bâtons de l'histogramme selon l'ordre d'apparition du type d'axillaire en allant de la base du bourgeon jusqu'à son apex.

*N.B. : ATTENTION, pour les bourgeons dans lesquels on observe deux unités de croissance (octobre 2013 individu 6 = « 10-13 6 » et décembre 2013 individu 1 = « 12-13 1 »), un bâton dans l'histogramme a été dessiné pour chaque UC. Les individus « 10-13 6 » et « 12-13 1 » sont donc représentés chacun par deux bâtons.*

La superposition ordonnée du pourcentage de chaque axillaire permet de lire quelle portion de l'unité de croissance vient d'être formée dans le bourgeon. On peut ainsi visualiser les périodes de début, milieu et fin de mise en place de chaque UC (rappel de la série des axillaires dans une UC en figure 5, p.12). Le début est représenté par des couleurs gris-vert clairs, le milieu par une palette de verts, et la fin par l'apparition des couleurs chaudes. Si l'on observe une série complète des axillaires de l'UC : couleur grise en bas, couleurs vertes au milieu, couleurs chaudes en haut, c'est que l'unité de croissance est entièrement préformée dans le bourgeon. C'est le cas des UC 1 et 2 dont on observe la série complète sur les individus « 11-13 1 », « 12-13 1 (UC 1) », « 01-14 2 » et « 24-04-14 1 ».

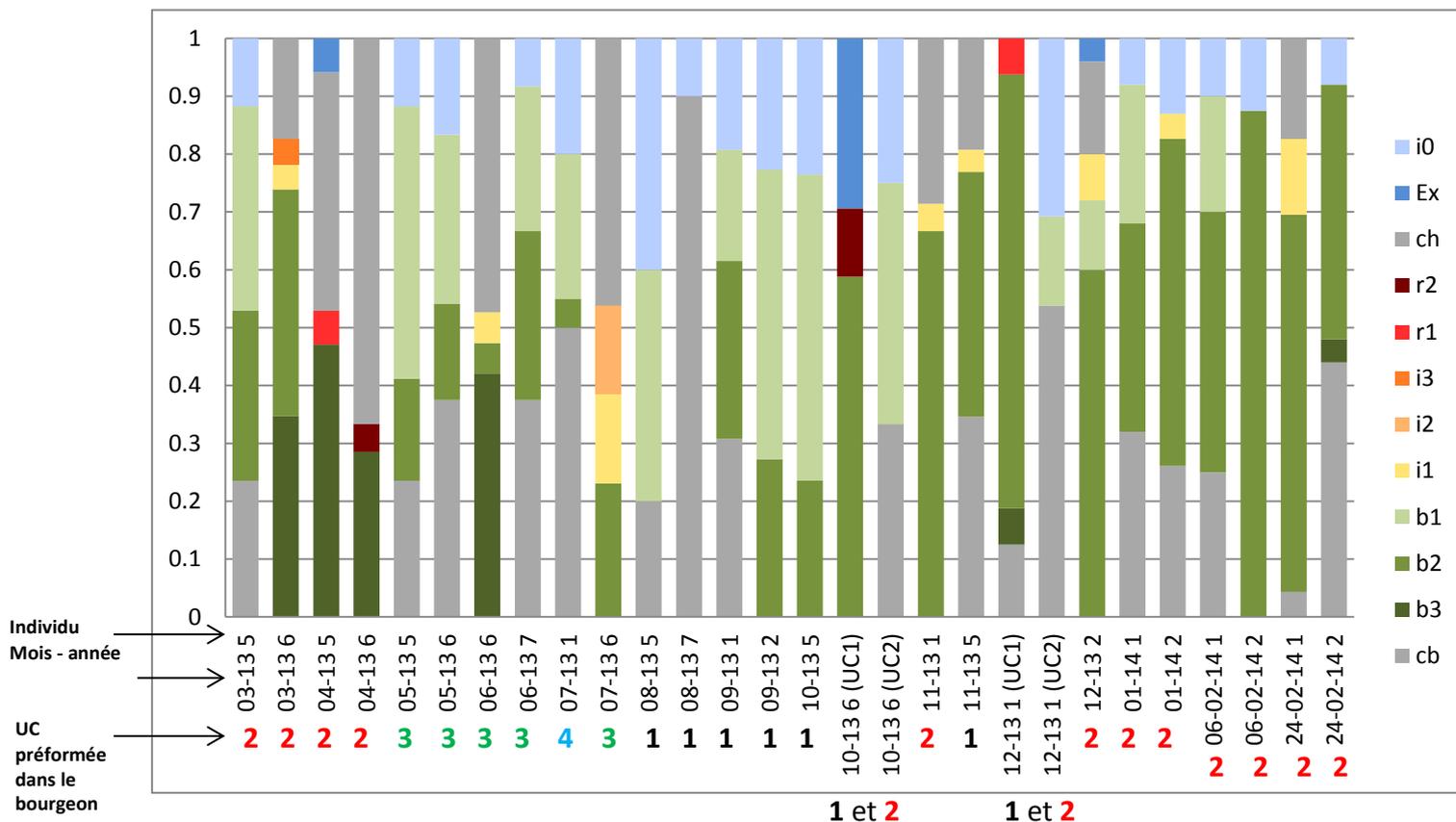


Figure 23 : Proportions des différents types d'axillaires de la base au sommet de chaque bourgeon (illustre une évolution au cours du temps)

Légende : **RAPPEL : schémas fig.14 et 15 et photos en annexe 6.**

- **Gris** : cataphylles (terme employé pour les feuilles n'axillant pas d'organes)  
Même couleur pour les cataphylles basses (cb) et pour les cataphylles hautes (ch). Elles sont séparées dans le bâton d'histogramme afin de pouvoir visualiser la succession des axillaires de la base à l'apex du bourgeon. Les cataphylles hautes indiquent le début de l'UC suivante.
- **Couleurs vertes** : différents stades de maturité des brachyblastes (b1, b2, b3)
- **Couleurs chaudes** : rameaux longs ou courts (supposés ou vérifiés)
  - jaune-orangé : axillaires INDETERMINES, on émet l'hypothèse que ce sont de futurs rameaux (i1, i2, i3) ;
  - rouges : rameaux identifiés avec certitude (r1, r2)
- **Couleurs bleues** : axillaires dont on n'est pas sûr non-plus de l'identification :
  - bleu clair : leur différenciation est trop peu avancée pour être identifiables (i0)
  - bleu foncé : cataphylles qui semblent ne rien axiller mais leur position dans la séquence de l'UC (par exemple au milieu d'une série de brachyblastes) ne les classe pas en (cb) ou (ch). Ce sont les Ecailles X (Ex), l'organe qu'elles axillent n'est peut-être pas dans le plan de coupe.

*N.B. : Les (Ex) n'ont pas une position correcte dans les bâtons de l'histogramme et devraient s'intercaler entre les brachyblastes.*

L'observation qui peut être faite – de toute évidence pressentie par l'observation globale de l'ensemble des coupes – est que les deux échantillons d'une même date ne contiennent pas toujours la même portion de l'UC en cours de formation (mars, juin, août, octobre, décembre, janvier, février). Il y a donc des petites variations inter-individuelles de moment de début et de fin de création des UC.

En faisant abstraction de ces variations entre échantillons d'une même date, la lecture chronologique (de gauche à droite et pour les dates différentes), permet d'estimer la vitesse à laquelle chaque UC est formée dans le bourgeon :

- Au printemps, l'apparition des couleurs chaudes alterne avec celle des teintes vertes : on passe rapidement de la création d'une UC à une autre. Les cataphylles et les jeunes brachyblastes constituent le début de l'UC et les brachyblastes matures et les rameaux représentent la fin de de

l'UC. Cette période correspond à l'organogenèse des UC 2 (fin), de l'UC 3 et de l'UC 4 (si présente).

- En août-septembre-octobre, c'est visiblement l'UC 1 qui est dans le bourgeon et qui se forme progressivement en trois mois : début en août (cataphylles et jeunes brachyblastes), milieu en septembre (brachyblastes plus avancés) et fin en octobre (premier bâton avec l'apparition d'ébauche de rameaux).
- Les mois d'octobre, novembre et décembre sont plus difficiles à lire en termes chronologiques du fait de la variabilité entre les individus échantillonnés (UC 1 ou UC 2 alternativement présentes).
- Tout au long de l'hiver (de décembre à février), c'est l'UC 2 qui est présente dans le bourgeon, elle commence son organogenèse en décembre (12-13 1, deuxième bâton pour lequel on observe des cataphylles et des jeunes brachyblastes) et on l'a retrouve en milieu ou fin d'UC de manière variable sur janvier-février (couleurs chaudes ou vert foncé, représentant des rameaux et des brachyblastes à un stade avancé).

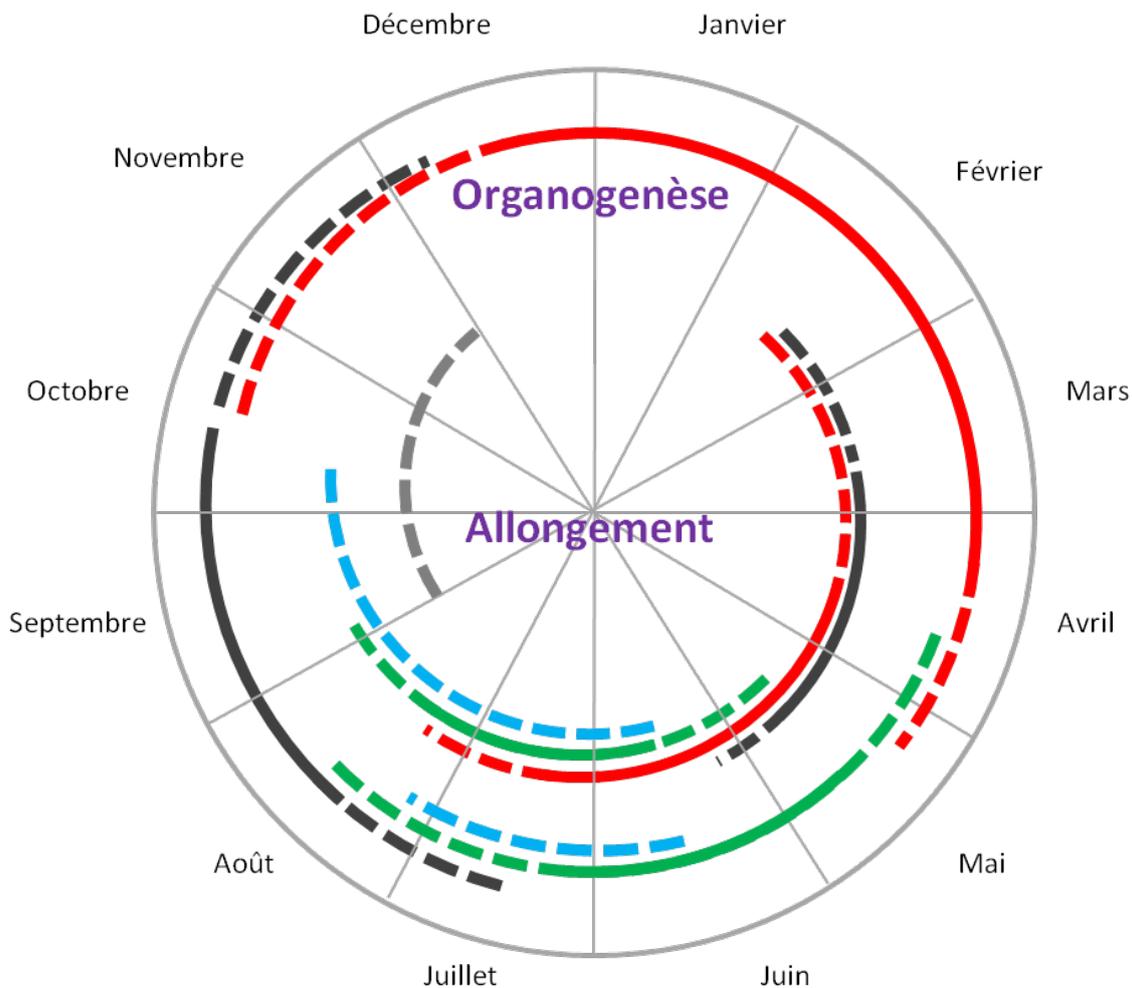
### **Bilan**

Nos résultats montrent que l'UC1 de la PA de l'année n se met progressivement en place de août à octobre de l'année n-1, que l'UC2 est initiée rapidement en octobre ou en décembre de cette même année, puis semble développer une lente maturation des axillaires pendant l'hiver, avant que son organogenèse ne soit achevée au début du printemps de l'année n. Ces deux UC sont préformées dans le bourgeon. Enfin, les UC 3 et 4 de la pousse annuelle sont très rapidement créées entre mai et juillet de l'année en cours, le fait que nous ne voyons jamais la totalité de l'UC dans un bourgeon suggère qu'elles sont en partie néoformée (organogenèse simultanée à l'allongement). Le sujet sera de nouveau discuté par la suite.

A présent que les périodes d'organogenèse et d'allongement de chaque unité de croissance sont définies, voici une synthèse de ces résultats, permettant de comparer les chronologies de chacun des processus de la croissance.

### **2.1.3 Représentation schématique des phénologies de l'organogenèse et de l'allongement des différentes unités de croissance.**

La figure 24 présente les périodes d'organogenèse de chaque UC, en parallèle des périodes de leur allongement, sur un cycle de croissance. Il est important de noter que pour l'organogenèse, les traits recouvrent les mois au cours desquels l'UC est observée dans le bourgeon apical. Cela ne signifie pas que le méristème est activement en train de produire des organes, il peut être en phase de dormance.



**Figure 24 : Schéma bilan : phénologie de l'allongement et de l'organogenèse de chaque unité de croissance au cours d'une année**

- **Organogenèse : extérieur du cercle – Allongement : centre du cercle.**
- **Les traits pleins** représentent ce qui est commun à toutes les observations, et les **pointillés** les cas plus particuliers (mais non isolés).
- **Code couleur : UC 1 : noir ; UC 2 : rouge ; UC 3 : verte ; UC 4 : bleue.**  
*N.B. : L'UC 4 est toujours en pointillés car elle n'apparaît pas systématiquement, plusieurs individus se sont avérés être tricycliques.*
- **Les pointillés gris** au centre du cercle, sur la période d'automne, représentent les quelques centimètres dont peuvent s'allonger l'UC 1 de la pousse annuelle de l'année à venir, avant que l'activité d'allongement ne s'arrête complètement en novembre, jusqu'en février de l'année suivante.

On observe, pour la plupart des Pins d'Alep suivis (traits pleins), que l'UC 1 est mise en place entre août et octobre, l'UC 2 entre novembre et avril, l'UC 3 entre mai et juillet et l'UC 4 en juillet si la pousse est tetracyclique. Pendant ce temps, l'allongement de la pousse annuelle sous-jacente au bourgeon a lieu globalement de mars à octobre, avec une phase de pause entre novembre et février.

Les UC 1 et 2, s'allongent simultanément de mars à avril et l'UC 2 continue à s'allonger au début de l'été, avec l'UC 3 qui démarre en juin et peut continuer jusqu'à la fin août. L'UC 4, si elle est mise en place, s'allonge généralement en début ou en fin d'été. Enfin, l'UC 1 s'est souvent déjà allongée de quelques centimètres l'année précédente, pendant l'automne.

La superposition des traits pleins verts de l'organogenèse et de l'allongement, soutient l'idée qu'une partie de l'UC 3 est néoformée. On pourrait effectivement penser que l'organogenèse de cette UC, de mai à début juin, correspond à une partie préformée, et que lorsque l'allongement commence, la partie simultanée

de l'organogenèse sur juin-juillet correspond à une partie néoformée. Nos résultats ne permettent pas de conclure si l'UC4 est entièrement ou en partie préformée.

Finalement, d'un point de vue général sur la croissance de la pousse annuelle – sans regarder au niveau de chaque unité de croissance – la figure met en évidence qu'allongement et organogenèse sont des processus simultanés au moins pendant quatre mois : de avril à juillet. Cette période de simultanéité des deux processus peut visiblement durer jusqu'à neuf mois, mais ce point sera discuté dans la partie 3.

Comme annoncé en introduction de la partie 2, la prochaine étape est de comprendre les variations de l'intensité de la croissance, au cours des périodes d'activité décrites ci-dessus.

## **2.2 L'intensité des deux processus de croissance de la pousse annuelle au cours du temps de Mars 2013 à Avril 2014.**

Basée sur la même structure que la sous-partie précédente, allongement et organogenèse sont traités ici séparément, avant d'être comparés sous forme d'un schéma bilan. Ensuite, l'étude des variations de l'intensité de l'organogenèse sera approfondie par des analyses statistiques et un indicateur plus global de cette intensité : la densité des productions axillaires au sein du bourgeon.

### **2.2.1 Variations d'intensité de l'allongement pour chaque unité de croissance.**

Les variations d'intensité de l'allongement de la pousse annuelle sont estimées grâce aux calculs d'accroissement de chaque UC (formule p.23, partie 1.4.1.1). Elles peuvent être lues sur les figures 19, 20 et 21 de la partie 2.1.1, pages 30 à 33 (à échelle individuelle et sur les deux profils de synthèse). Les variations sont synthétisées sur les courbes en pointillés pour la pousse annuelle entière (pourcentages du maximum d'accroissement au cours d'un cycle).

### **2.2.2 Variations d'intensité de l'organogenèse pour chaque unité de croissance : volume méristématique dans le bourgeon apical.**

Il apparaît sur l'histogramme de la figure 25 que le méristème atteint les volumes les plus importants entre les mois d'août et octobre. Un volume important est également atteint en décembre mais le volume du méristème semble relativement petit pendant la période hivernale. Concernant les résultats pour le printemps et le début d'été (d'avril à juillet), le volume du méristème est très variable, mais il n'atteint pas les valeurs maximales trouvées entre août et décembre et présente des minima non observés sur les autres mois.

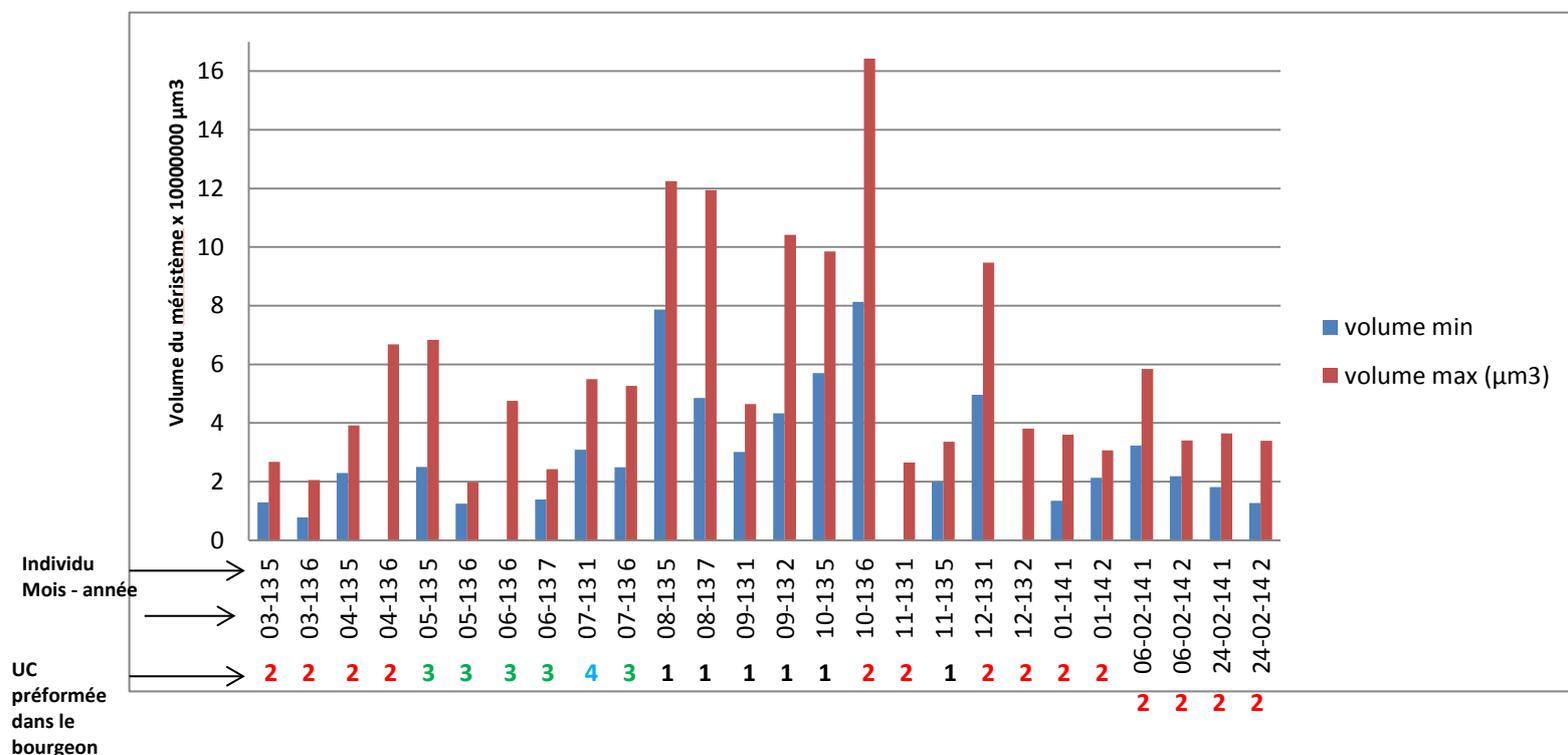


Figure 25 : Le volume méristématique de chaque bourgeon illustre une évolution au cours du temps

A présent que l'on connaît les périodes de croissance de chacune des UC de la pousse annuelle, on peut relier ces résultats aux observations de la partie 2.1.2 afin de voir si le volume du méristème a un lien avec :

- le rang de l'UC en cours d'organogenèse ;
- la présence dans le bourgeon du début, du milieu ou de la fin de l'UC ;
- une compétition avec l'allongement des UC sous-jacentes durant des périodes d'intense activité de croissance (printemps et en début d'été).

➤ Eté – automne (début) :

Le méristème atteint des maxima de volume pendant cette période, qui comprend essentiellement le début d'initiation de l'UC 1 ou de l'UC 2 dans le bourgeon 10-13 6 (cf. histogramme des proportions axillaires, figure 23 p.36).

➤ Automne (fin) – hiver :

Le méristème est plus petit que la période précédente. Entre les mois de novembre et février, les bourgeons contiennent, pour la majorité des échantillons, le milieu ou la fin de la série d'axillaires d'une UC (l'UC 1 pour le bourgeon 11-13 1, et l'UC 2 pour les autres). Le plus grand volume du bourgeon 12-13 1 confirme les observations du point précédent : le méristème atteint un grand volume lors du début d'initiation de l'UC 2.

➤ Printemps :

Le lien entre le volume du méristème et le rang de l'UC, ou l'état d'avancement de son organogenèse, est plus difficile à observer pendant cette saison. Cependant, sachant que les UC générées changent alors rapidement, on peut d'abord émettre l'hypothèse que le pas de temps d'un mois ne permet pas d'observer les volumes maxima du méristème. Une autre hypothèse qui pourrait être avancée est la pression éventuelle que peut exercer l'allongement des UC sous-jacentes, limitant l'intensité d'organogenèse pour les UC 3 et 4. La compétition avec l'allongement pourrait alors expliquer le fait que les maxima de volume ne soient pas atteints au cours de cette période ou bien que les minima soient eux, uniquement observés à ce moment-là.

*N.B. : Les variations semblent être similaires pour le volume maximal et le volume minimal, leur corrélation sera vérifiée par une régression linéaire dans la partie 2.2.4*

**Bilan :**

Nos résultats suggèrent que le méristème atteint son volume maximal, sur toute la saison de végétation, lors de l'organogenèse des UC 1 et 2. Cependant, il est possible que le pas de temps de l'échantillonnage ne permette pas d'observer les maxima pour les UC 3 et 4, à une période où la croissance dans son ensemble s'accélère. Par ailleurs, il semblerait que le méristème soit plus volumineux en début d'initiation d'UC (nombreux cataphylles et brachyblastes stade 1), qu'en milieu ou fin de mise en place d'une UC. Enfin, nous émettons l'hypothèse qu'une compétition avec l'allongement au printemps, joue sur les extrema de volume méristématique.

Comme annoncé au début de la partie 2.2, nous allons à présent synthétiser les observations qui viennent d'être exposées, sous forme d'un schéma d'interprétation.

### 2.2.3 Représentation schématique des variations d'intensité de l'organogenèse et de l'allongement au cours du temps.

La figure 26 superpose les périodes d'organogenèse et d'allongement des unités de croissance successives de la pousse annuelle. Elle représente aussi des variations d'intensité de chacun de ces processus, par UC. Il est important de noter que les deux courbes du schéma correspondent à un mode de représentation. Elles sont tracées pour relier les points correspondants aux données mensuelles des suivis.

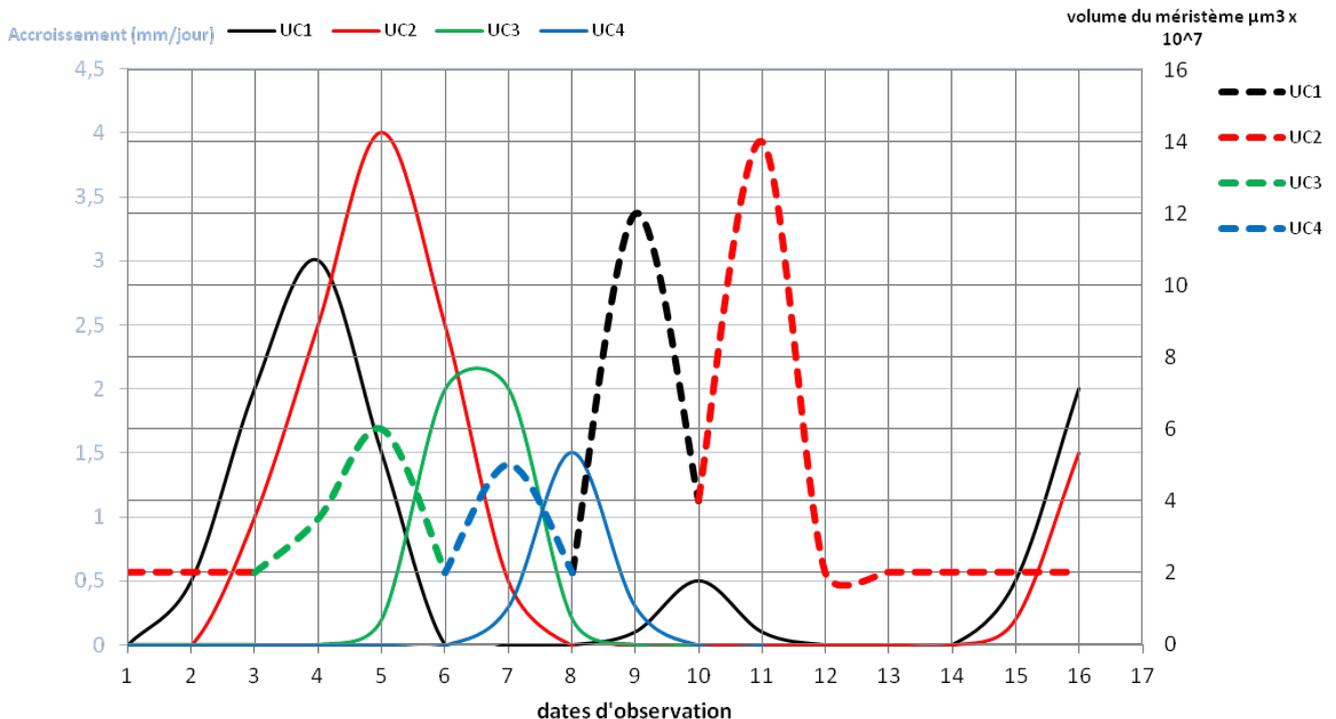


Figure 26 : Schéma bilan : Chronologie de l'intensité de l'allongement (traits plein) et de l'organogenèse (traits pointillés) de chaque unité de croissance

#### Legende :

- 1 : janvier année n ; 13 : janvier année n+1
- Courbe traits pleins : taux d'accroissement de chaque UC au cours du temps (mm/jour)
- Courbe traits pointillés : proposition d'intensité de l'organogenèse, basée sur les variations du volume méristématique (µm³) au cours du temps.
- Forme en cloche des courbes pointillées : variations de volume du méristème selon qu'il soit en train d'initier le début, le milieu ou la fin de l'UC en cours de formation :
  - Petit volume pour les premières cataphylles, début de l'organogenèse d'une UC.
  - Volume maximal au début de l'initiation de la série de brachyblastes de l'UC, début avancé.
  - Petit volume après avoir mis en place les rameaux ou les cônes, fin de l'organogenèse de l'UC.
- Le volume des méristèmes des UC 1 et 2 atteint des maxima qui n'ont pas été retrouvés pour les UC 3 et 4 (cf.figure 25)
- La remontée de la courbe en trait plein noir au mois d'octobre (10), correspond au début d'allongement automnal de l'UC 1 de la pousse annuelle suivante, qui est parfois observé.

La juxtaposition des chronologies d'organogenèse et d'allongement de chaque UC illustre que l'organogenèse des UC 3 et 4 se fait simultanément à l'allongement des UC 1 et 2 tandis que celle des UC 1 et 2 se fait en général à une période où il n'y a pas, ou très peu, d'activité d'allongement de la pousse sous-jacente.

On notera aussi que si l'allongement des UC 1 et 2 a lieu l'année suivant celle de leur organogenèse, ce n'est pas le cas pour les UC 3 et 4, dont l'organogenèse et l'allongement se font la même année. Encore une fois, on voit ici que le début de l'allongement de ces dernières UC démarre avant que leur organogenèse ne se termine.

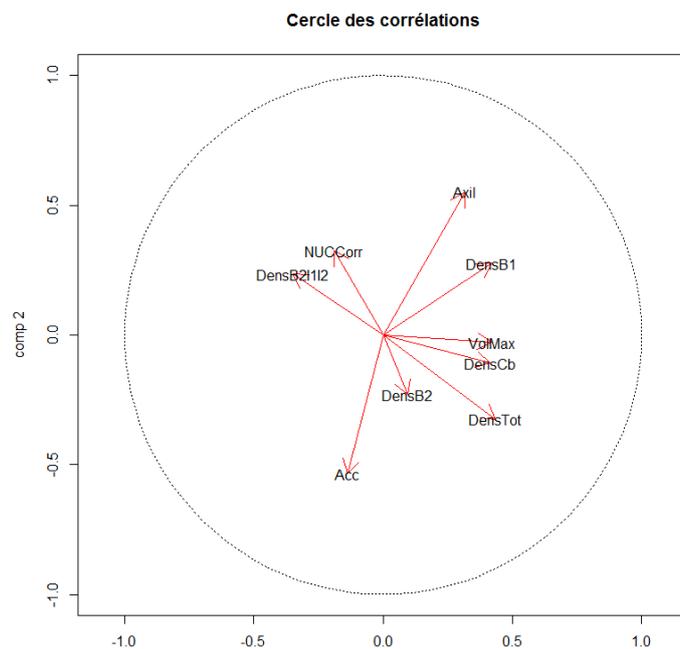
Comme l'intensité de l'organogenèse atteint des maxima moins importants pendant la période où l'allongement, lui, est très actif, on pourrait émettre l'hypothèse que l'allongement ralentit l'organogenèse, comme évoqué dans la partie précédente. Par ailleurs, les UC 3 et 4 ayant des traits morphologiques assez distincts des deux premières UC (voir figure 4, p.12), on pourrait se demander si l'éventuelle compétition de l'allongement sur l'organogenèse au printemps, a une influence sur le nombre et le type d'axillaire mis en place sur les dernières UC.

Une grande partie des observations concernant l'intensité de l'organogenèse reste cependant de nature qualitative et le fait de ne pas connaître précisément les différentes formes du méristème au cours d'un plastochrone reste une possibilité de biais importante. La partie suivante cherche à vérifier les observations concernant les facteurs influençant le volume méristématique puis, dans un second temps, développe un second indicateur de l'intensité d'organogenèse : la densité des axillaires observés dans le bourgeon apical.

#### 2.2.4 Etude statistique des variables corrélées au volume du méristème.

##### ACP

L'ACP a été effectuée sur les variables décrites en partie 1.4.2.2. Comme cette ACP est construite sur très peu d'observations par rapport à la quantité de variables étudiées, certaines variables ont été supprimées du jeu de données initial (présenté en annexe 7). Ces variables sont celles étant trop peu représentées dans le jeu de données (comme certaines densités) ou ne présentant pas un lien suffisamment direct avec le volume méristématique (variables sur l'UC sous-jacente au bourgeon). Le cercle des corrélations de la figure 27 rassemble les variables que l'on a souhaité garder dans l'ACP.



**Figure 27 : Cercle des corrélations**

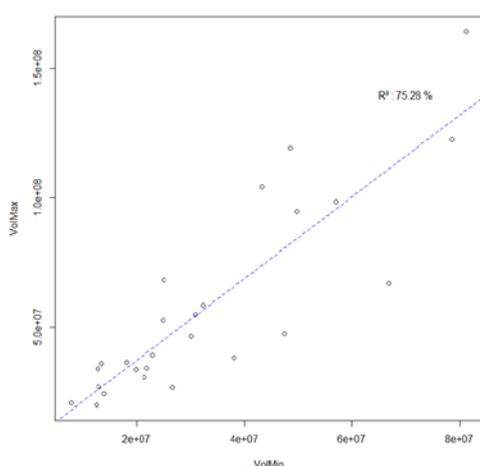
La première observation que l'on peut faire sur ce cercle des corrélations, est que les axes 1 et 2 – qui expliquent le mieux la variabilité du jeu de données – sont peu représentatifs des variations des différentes variables projetées sur le cercle. Ces dernières sont en effet assez éloignées du cercle des corrélations. Les corrélations qui pourront être lues entre les variables projetées seront donc probablement peu robustes. Encore une fois, cela est probablement dû au faible nombre d'observations.

Globalement, l'axe 1 du cercle explique une partie de la variabilité des différentes densités d'axillaires (sauf celle des brachyblastes au stade 2) et du volume maximal du méristème. L'axe 2 explique une partie de la variabilité du type d'axillaires qui est observé sous le méristème (Axil), de l'accroissement de la pousse annuelle sous-jacente au bourgeon et, dans une moindre mesure, celles de l'UC en cours de formation et de la densité de brachyblastes au stade 2.

DensTot, DensB1 et DensCb apparaissent corrélés positivement à VolMax et DensB2I1I2 négativement (voir la légende de la figure 27 pour le nom complet des variables). NUCCorr, Axil, Acc et DensB2 semblent ne pas avoir de lien avec les variations de VolMax (nous rappelons que NUCCorr et Axil sont des variables discrètes, il est donc possible que l'ACP ne fasse pas ressortir de corrélation même dans le cas où il y en aurait une).

Ces premiers résultats confirment les observations de la partie 2.2.2 sur le fait que le volume méristématique soit plus grand en début d'initiation d'UC (lorsqu'il initie les cataphylles et les premiers brachyblastes), et plus petit lorsqu'il vient d'initier des rameaux (représentés par le I1 (indéterminé 1) et I2 (indéterminé 2) de la variable – cf. typologie figure 13, p.19 et densité par type d'axillaires partie 2.2.5 à suivre).

Les représentations graphiques de la répartition des volumes de méristème en fonction de chaque variable du cercle de corrélations ont été étudiées, avec un essai de régression linéaire à titre indicatif.



La première régression linéaire effectuée est celle entre le volume maximal et le volume minimal du méristème afin de vérifier qu'il était acceptable de ne regarder que le volume maximal du méristème (fig. 28).

$$\text{VolMax} = 5.533 \cdot 10^{-6} (p=.446) + 1.579 \cdot \text{VolMin} (p=9.51 \cdot 10^{-9})$$

R<sup>2</sup> = 75.29 %

En effet, Volmin explique plus de 75 % de la variabilité de VolMax (avec une probabilité critique très inférieure à 5%). Il est donc raisonnable de n'étudier que les variations du volume maximal mesuré.

**Figure 28 : Répartition des données VolMax~Volmin**

Les autres représentations (figures 29 à 34) illustrent bien la corrélation positive ou négative du méristème en fonction des différentes variables. En revanche il est intéressant de noter que, bien que le VolMax ait un bon R<sup>2</sup> avec la densité de cataphylles (DensCb), il n'y a que très peu d'observation pour les densités importantes de cataphylles, le R<sup>2</sup> est donc probablement un peu fort et il faudra vérifier la probabilité critique. Inversement, contrairement à ce que suggérerait le cercle des corrélations, le volume méristématique semble diminuer avec des valeurs croissantes de densités de brachyblastes au stade 2 (DensB2) et avec l'augmentation de l'accroissement de la pousse annuelle sous-jacente (Acc).

L'ensemble des relations sera étudié plus finement avec la construction de la régression linéaire.

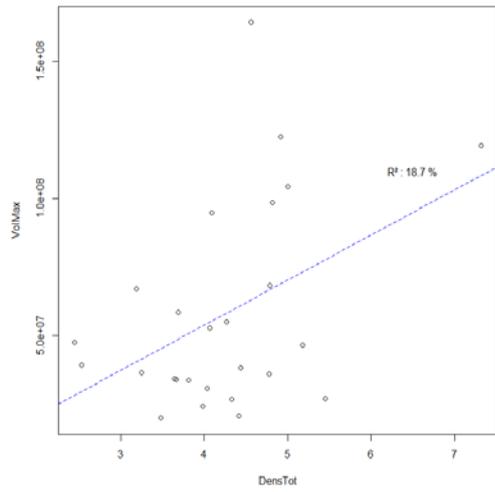


Figure 29 : Répartition des données de VolMax~DensTot

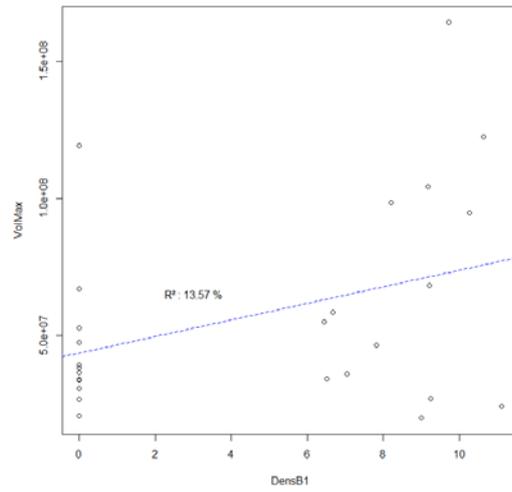


Figure 30 : Répartition des données de VolMax~DensB1

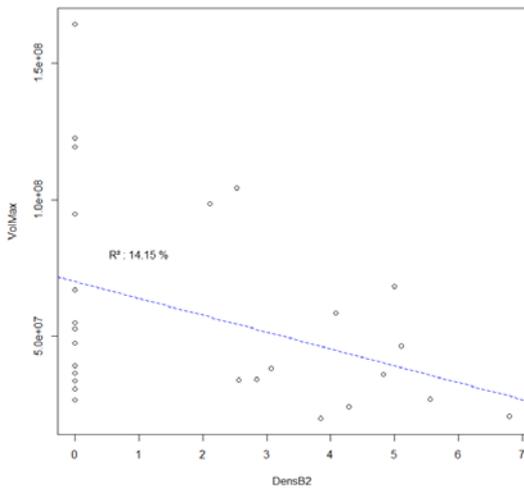


Figure 31 : Répartition des données de VolMax~DensB2

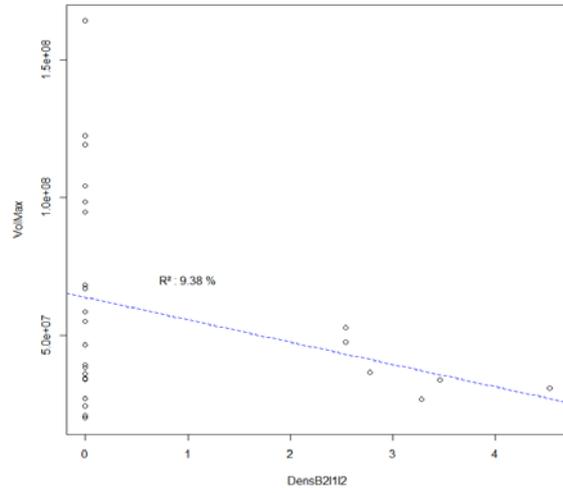


Figure 32 : Répartition des données de VolMax~DensB2I1I2

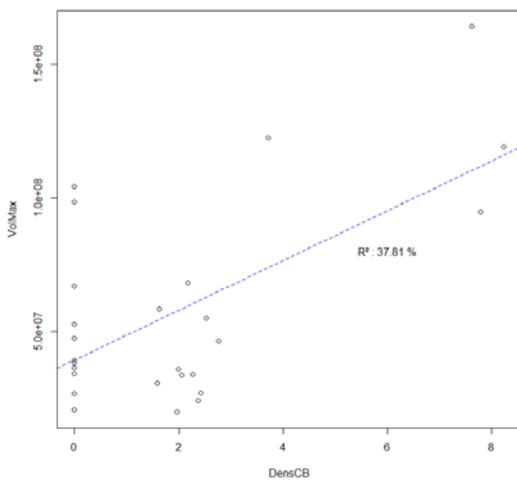


Figure 33 : Répartition des données de VolMax~DensCb

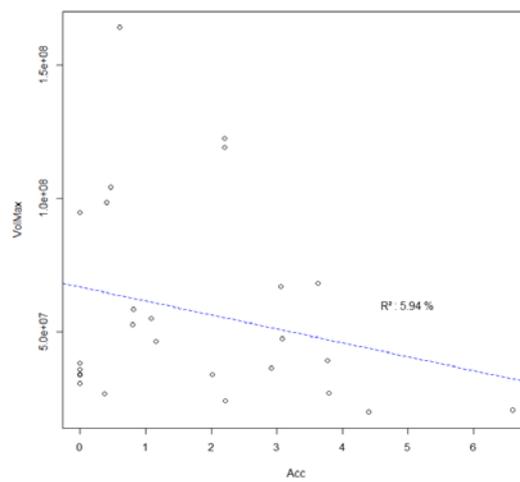
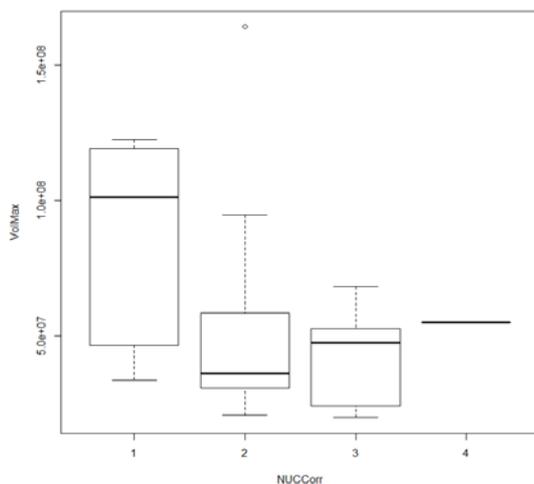


Figure 34 : Répartition des données de VolMax~Acc

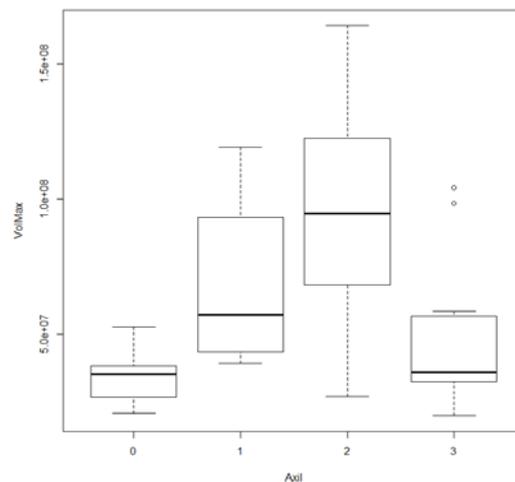
### ANOVA-Boxplot

Pour visualiser les variations de VolMax en fonction des deux variables discrètes : Axil (axillaires juste au-dessous du méristème) et NUCCorr (UC en cours de formation), des boîtes à moustaches sont représentées en figure 35 et 36. D'après les explications données en partie 1.4.2.2 (p.26) sur la construction de graphique, 50 % des observations sont observées à l'intérieur de la boîte et 50% en dehors. Ce graphique met surtout en évidence que le méristème est de petit volume lors de la mise en place des premières cataphylles de l'UC (catégorie 0) et double ou triple de volume lorsque qu'il est en train de générer la fin de la série de cataphylles (cat. 1) et les premiers brachyblastes (cat. 2). Dès que l'organogenèse passe à un niveau plus avancé dans la série des brachyblastes (cat. 3), le volume du méristème atteint des valeurs moins importantes, il est donc *a priori* moins actif.

Concernant les variations du volume du méristème en fonction de l'UC en cours de formation, les maxima de VolMax sont observés pour l'UC 1 bien que les valeurs restent très variables (probablement selon le type d'organe en cours de formation et le niveau dans la séquence de l'UC), les volumes sont en majorité plus faibles pour l'UC 2 comparée à l'UC 1 mais comprennent encore des valeurs plus grandes que celles observées pour l'UC 3. Il est cependant important de souligner que moins d'observations sont comprises dans la catégorie UC 3 que dans la catégorie UC 2.



**Figure 35 : Volume du méristème en fonction du rang de l'UC en cours de formation dans le bourgeon.**



**Figure 36 : Volume du méristème en fonction de la catégorie d'axillaires observés près du méristème : 0 : premières cataphylles, 1 : cataphylles avancées dans la série, 2 : petits brachyblastes au stade 1, 3 : grands brachyblastes au stade 1.**

Des ANOVA ont également été réalisées mais les résultats sont peu probants (les intervalles de confiance des différences entre catégories contiennent systématiquement la valeur nulle). Cela est probablement dû au faible nombre d'observations du jeu de données.

### Régression linéaire, modèle final

Après avoir effectué toutes les combinaisons possibles de variables dans la régression linéaire, les deux modèles finaux sont présentés dans la figure 37. Le premier modèle, LM1, est celui qui minimise l'AIC (avec un bon  $R^2$  et des variables significatives), le deuxième modèle, LM2, est celui qui maximise le  $R^2$ . Il apparaît avec ces deux modèles, que les variations du volume maximal du méristème sont conditionnées principalement par :

- le fait que le bourgeon contienne le début ou la fin de d'une UC (représenté par les densités de cataphylles (DensCb) pour le début, et la densité de brachyblastes au stade 2 et de rameaux (DensB2I1I2) pour la fin de l'UC) ;
- le type d'organe en cours de formation (Axil) ;  
*N.B. : Pour rappel, Axil est une variable discrète qui décrit les axillaires présents juste au-dessous du méristème : 0 = premières cataphylles, 1 = dernières cataphylles, 2 = premiers brachyblastes, 3 = brachyblaste de milieu ou fin de série.*
- l'allongement de la pousse annuelle sous-jacente au bourgeon (Acc).

Dans le modèle LM1, le volume méristématique augmente avec la densité de cataphylles (qui est importante lorsque l'organogenèse commence à générer les premiers brachyblastes d'une UC) et diminue avec l'augmentation de l'allongement de l'UC sous-jacente.

Dans le modèle LM2, le volume méristématique diminue avec la densité des pièces de fin d'UC (DensB2I1I2) ainsi qu'avec la compétition imposée par l'allongement de la pousse sous-jacente (Acc), et il diminue également avec le type d'axillaire que le méristème est probablement en train d'initier. Cette dernière variable Axil est à considérer avec précaution car elle est discrète.

Modele	AIC	R2	Intercept	CoeffA	pValueIntercept	pValueCoeffA	CoeffB	pValueCoeffB	CoeffC	pValueCoeffC
VolMax <sup>''</sup> DensCb + Acc	750.0173	0.5035760	64935663	9127855	1.687744e-04	0.005606571	-9017646	0.047371918	NA	NA
VolMax <sup>''</sup> DensB2I1I2 + Acc + Axil	751.2875	0.5213639	168013928	-31154592	6.429884e-05	0.005301576	-20362032	0.001420886	-23700540	0.02587416

**Figure 37 : Résultats des deux meilleures régressions linéaires**

Les variables qui ressortent dans les deux modèles finaux répondent bien aux remarques faites par simple observation en comparant les valeurs de volume méristématique à l'histogramme des quantités d'axillaires par bourgeon (fig. 23 et 25) : le volume méristématique est plus important au début de l'organogenèse de l'UC qu'à la fin, et il peut être soumis au printemps, à une compétition de l'allongement de la pousse annuelle sous-jacente.

La régression linéaire supposant l'homoscédasticité des résidus (c'est-à-dire que ces derniers suivent une loi normale, indépendante des variations du volume du méristème), on compare les quantiles des résidus observés avec ceux d'une loi normale de même variance (fig. 38 et 39). De plus, on regarde la répartition des valeurs de résidus en fonction des valeurs prédites par le modèle du volume du méristème (fig. 40 et 41). Avec ces deux graphiques, il apparaît clairement que le modèle LM1 est plus robuste que LM2 :

- Pour le modèle LM2 les résidus prennent légèrement une forme en V en fonction de la valeur du volume, il n'y a semble-t-il pas indépendance des résidus avec la variable prédite.
- Sur le graphe Normal Q-Q (quantiles loi normale-quantiles résidus), les points sont moins bien alignés sur la droite que pour le modèle LM1.

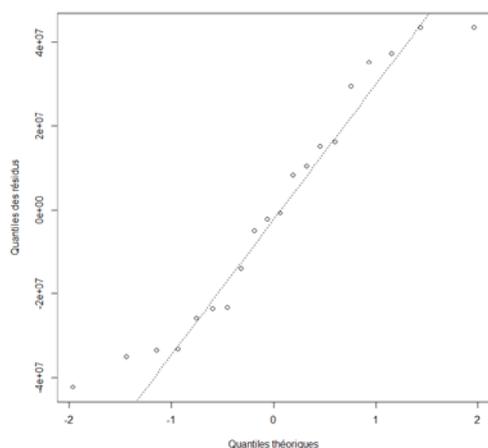


Figure 38 : Normalité des résidus LM1

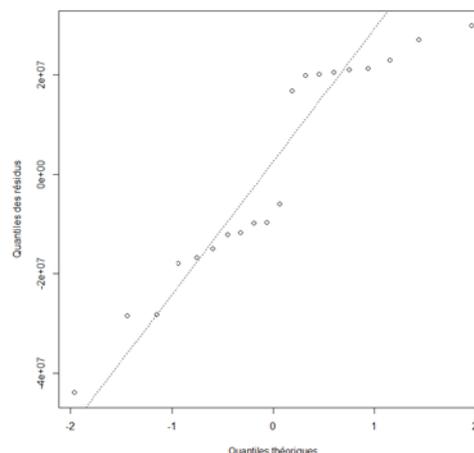


Figure 39 : Normalité des résidus LM 2

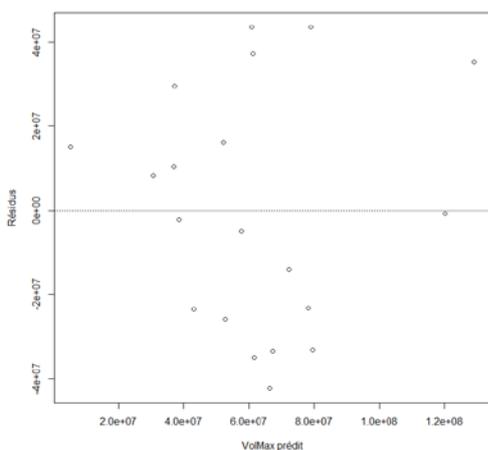


Figure 40 : Indépendance des résidus LM 1

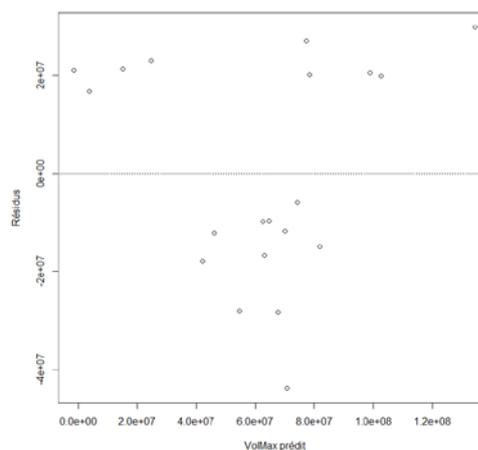


Figure 41 : Indépendance des résidus LM 2

Le modèle de régression linéaire le plus robuste que l'on ait pu construire sur les données récoltées dans les suivis, pour expliquer les variations du volume maximal du méristème (indicateur d'une intensité de l'organogénèse) est le suivant :

$$\text{VolMax} = 64935663 (p=1.688e-04) + 9127855 * \text{DensCb} (p=0.0056) - 9017646 * \text{Acc} (p=0.04737)$$

$$R^2 = 0.5035760$$

$$\text{AIC} = 750.0173$$

Ce modèle explique plus de 50 % des variations de volume observé du méristème, il fait intervenir les variations de la densité de cataphylles et de l'allongement de la pousse sous-jacente au bourgeon : plus les cataphylles sont denses, plus le méristème a un grand volume (début d'initiation d'une UC et plus particulièrement des premiers brachyblastes qui viennent après les cataphylles) ; et plus l'accroissement de la PA sous-jacente au bourgeon est grande, plus le méristème a un petit volume, il est probablement soumis à la compétition de l'allongement.

Dans le cadre de notre étude, les variations du volume méristématique restent un indicateur biaisé de la chronologie d'une intensité d'organogenèse, car le pas de temps de l'échantillonnage ne permet pas de capter les variations du volume au cours d'un plastochrone (pas de temps plus petit). Il est donc probable que certains échantillons ne soient en réalité pas comparables, car à des phases distinctes du plastochrone. La partie suivante propose un indicateur supplémentaire des variations d'intensité d'organogenèse au cours du temps.

### **2.2.5 Densité des productions d'axillaires : une estimation de l'intensité de l'organogenèse entre deux dates d'échantillonnage.** (cf. partie 1.4.2 pour les calculs de densité)

L'objectif de cette partie est de proposer un second indicateur de l'intensité de l'organogenèse. Cet indicateur se différencie de celui du volume méristématique car il n'illustre pas une activité d'organogenèse à l'instant  $t$  auquel le bourgeon a été plongé dans le fixateur, mais reflète plutôt à quel point le méristème a été actif entre deux dates d'échantillonnage.

En effet, si la densité d'axillaire est importante dans le bourgeon, on peut émettre l'hypothèse que l'organogenèse a été intense depuis l'échantillonnage précédent, si elle est faible, l'organogenèse fut probablement moins intense et les bourgeons seraient plutôt entrés dans une phase de maturation des axillaires (qui grossissent et entraînent une diminution de la densité).

Cependant, il faut tenir compte du fait que la densité ne peut mettre en évidence le fait que le méristème soit au repos ou non, elle atteste d'une activité passée du méristème. Il faut donc interpréter les données en prenant en compte le fait que ce soit la même UC présente ou non dans le bourgeon lorsque l'on compare deux dates. Par ailleurs, les individus de chaque bourgeon sont différents, donc chaque observation est à nuancer par la variabilité inter-individuelle couramment observée. Enfin, encore une fois, le pas de temps de l'échantillonnage est grand, et ne permet pas de capter tous les axillaires produits pour une unité de croissance entre deux dates d'échantillonnage.

#### **Densité totale**

Nous rappelons ici que ce qui est appelé « densité » est en fait un indicateur de la densité réelle des axillaires du bourgeon, du fait de ne pouvoir observer sur une coupe la totalité des axillaires présents dans le bourgeon (cf. explications dans la partie 1.4.2.1, p.24).

La figure 42 présente un histogramme de la densité totale des axillaires pour chaque bourgeon. Les bâtons sont colorés en bleu et rouge afin de grouper visuellement les répétitions d'échantillons à une même date. Les densités sont exprimées en nombre de pièces par millimètre (cf. partie 1.4.2.1., p.24). On remarque, avec les barres d'erreur, que la densité totale varie au maximum de 1 à 2 pièces par millimètre (barres d'erreur) selon la coupe observée (rappel : le calcul des densités totales est moyenné sur trois coupes d'un même bourgeon).

La densité de l'ensemble des axillaires observables sur les coupes atteint des maxima en mars, en mai et en août. Le printemps est la période où la densité totale atteint des minima (avril et juin). La densité tourne autour des mêmes valeurs moyennes pendant l'automne et l'hiver. On retrouve donc dans cet histogramme l'intuition d'une forte activité d'organogenèse en été, plus faible en hiver et très variable au printemps.

Toutefois, cet histogramme est délicat à interpréter car les bourgeons contiennent des axillaires de nature et de stade de maturité variables. Il est donc peu rigoureux de comparer des densités de types d'axillaires différents. Par exemple, une densité de trois brachyblastes au stade 3 (grosses pièces) sur un millimètre ne représente pas la même chose qu'une densité de trois cataphylles par millimètre qui seraient alors plus espacées car ce sont en général des pièces plus petites.

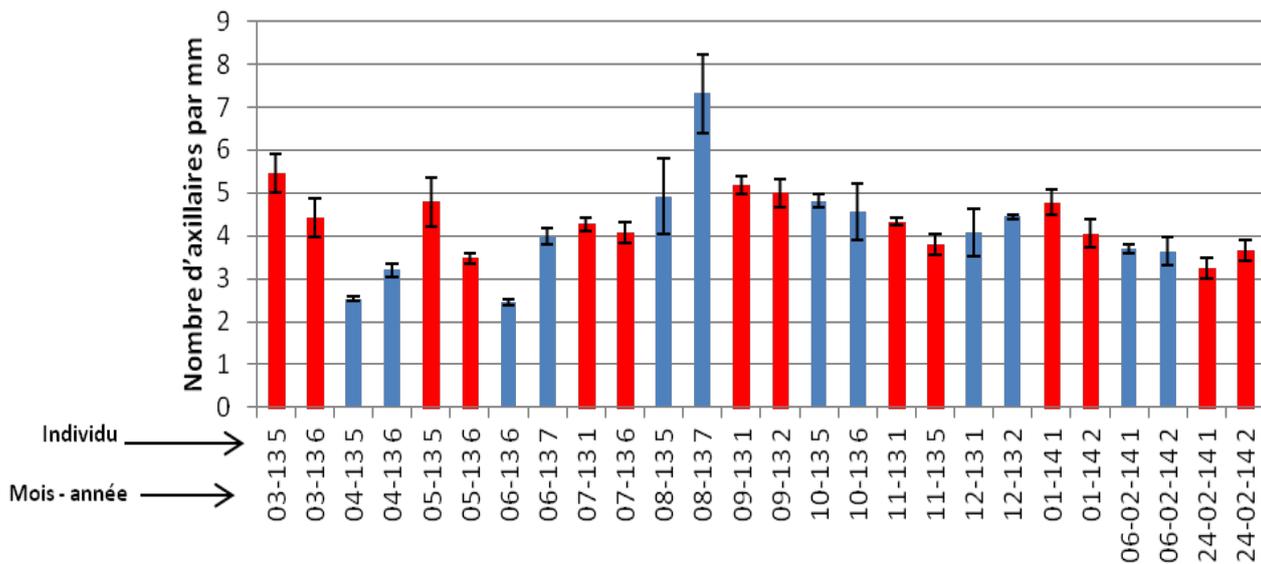


Figure 42 : Densité totale de l'ensemble des axillaires de chaque bourgeon  
 ➤ Bleu/Rouge : distinction des répétitions d'échantillon pour une même date  
 ➤ Barre d'erreur : moyenne des mesures sur 3 coupes

Densité par type d'axillaire (cf. partie 1.4.2.1. pour l'explication de la légende)

N.B. : les densités par type d'axillaire, contrairement aux densités totales, ont été estimées sur une seule coupe par bourgeon.

Si l'on tient compte du fait que la même UC peut-être présente dans les bourgeons de deux dates d'observation, la lecture de l'historgramme de la figure 43, met en évidence les mois où l'organogenèse a été la plus active, c'est-à-dire ceux pour lesquels la densité des axillaires de petite taille (cataphylles et brachyblastes à un jeune stade) est la plus grande.

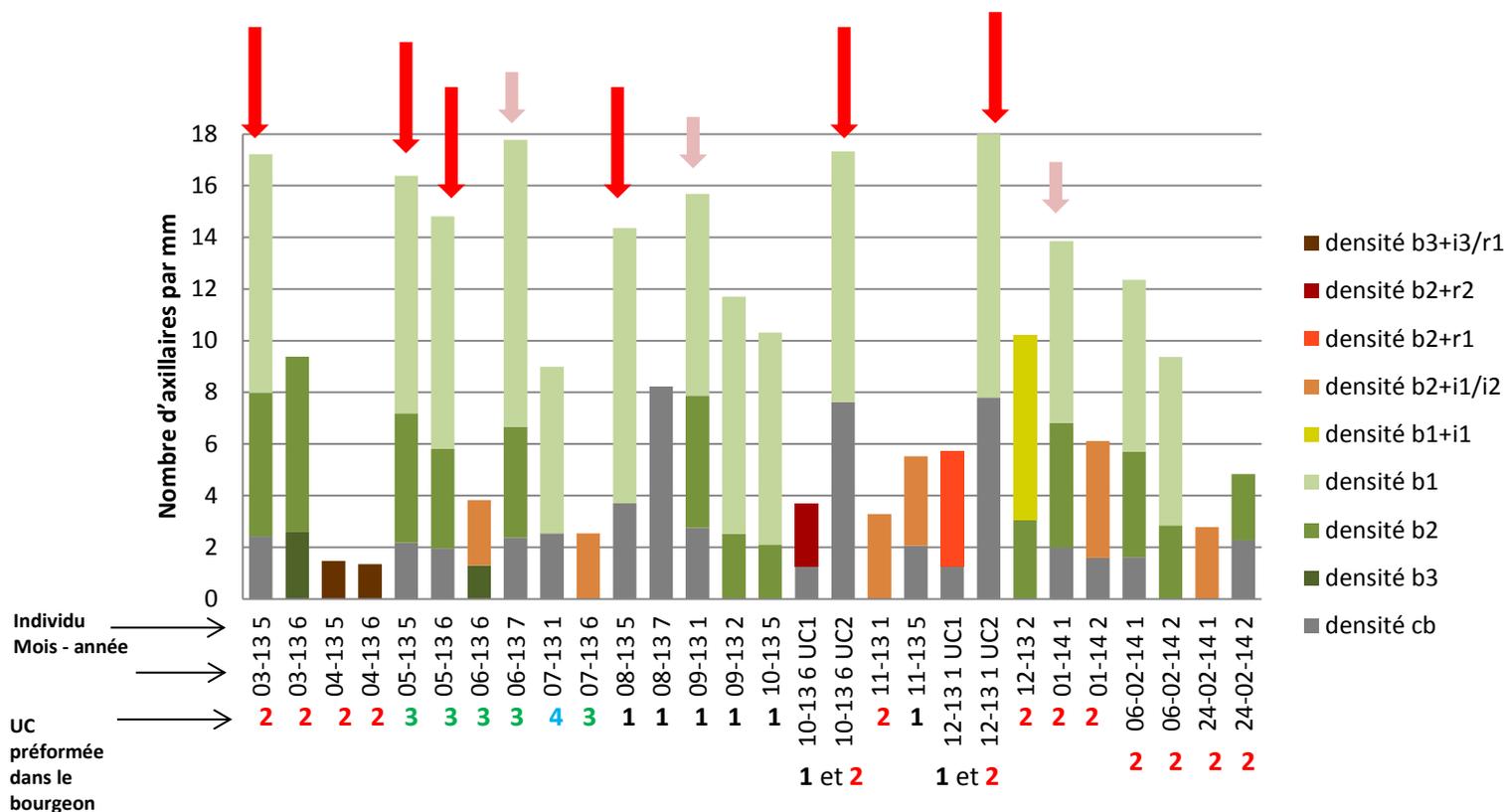


Figure 43 : Densités de chaque type d'axillaire de chaque bourgeon

Les bourgeons qui présentent une intense activité d'organogenèse sur le mois passé sont donc ceux avec des grandes valeurs de densité, des bâtons de couleur grise et verte et pour lesquels l'UC qu'ils contiennent apparaît pour la première fois (ou avec un net rajout d'organes depuis la dernière date). Les échantillons concernés correspondent aux mois de mars, mai, août, octobre et décembre, ils sont indiqués sur la figure par les flèches rouges. Le mois d'août correspond au début de la formation de l'UC 1, octobre-décembre à celui de l'UC 2, et le mois de mai à celui de l'UC 3. Mars présente une reprise de l'organogenèse de l'UC 2, démarrée l'année n-1.

On remarque cependant que, si les mois de juin, septembre et janvier contiennent une UC dont l'organogenèse a déjà démarré, un nombre non négligeable de nouveaux axillaires est tout de même apparu ; les bourgeons concernés sont indiqués par des flèches roses.

Si cet histogramme ne met pas en évidence de différence notable d'intensité d'organogenèse selon le rang de l'UC en cours de formation, ni selon que les UC sous-jacentes soit plus ou moins intensément en cours d'allongement. Il maintient en revanche un lien évident avec le fait que ce soit le début, le milieu ou la fin de l'UC qui soit présente dans le bourgeon.

Enfin, un autre élément mis en évidence par cette mesure de densité d'axillaires est une différence de vitesse de maturation des organes selon le moment de l'année. Par exemple au printemps, lors de l'organogenèse de l'UC 3, on observe souvent des brachyblastes au stade 2 (vert foncé) en même temps que beaucoup de brachyblastes au stade 1 (vert clair). Les brachyblastes semblent donc rapidement entrer en phase de maturation alors que de nombreux autres continuent à être initiés par le méristème. De même, en avril, les rameaux et les brachyblastes sont observés à un stade très avancé (couleur marron), ce qui n'est pas le cas pendant l'automne et l'hiver. Il serait intéressant, dans le cadre de nouvelles études, de travailler aux périodes de maturation des axillaires, et aux facteurs déclencheurs de ces processus (cf. partie 3).

Pour conclure, cet histogramme permet de constater des pics d'intensité d'organogenèse en début de création des UC 1, 2 et 3 (à intensité égale) pour les mois de mai (UC 3), août (UC 1), octobre et décembre (UC 2). Le mois de mars semble également actif en termes d'organogenèse (continuation de la mise en place de l'UC 2). De même, mais dans une moindre mesure, les mois de juin (UC 3), septembre (UC 1) et janvier (UC 2) présentent une activité soutenue d'organogenèse pour la mise en place des brachyblastes (c'est-à-dire le milieu de la série d'axillaires de chaque UC).

Les différences avec le schéma bilan de la figure 26, p.42, ressortent surtout pour les mois de mars et janvier pour lesquels il semblerait que, au cours des jours précédant la date d'échantillonnage, l'organogenèse était *a priori* relativement importante, ce qui n'est pas mis en évidence par l'étude du volume méristématique.

A présent que nous connaissons la chronologie de la croissance de la pousse annuelle de 2013, et le début de celle de 2014, il est intéressant de vérifier si le climat de la période mars 2013 – avril 2014 était bien représentatif d'un climat méditerranéen.

## 2.3 Bilan sur le climat

Le diagramme ombrothermique et le nombre de jour de gelée par mois est comparé aux moyennes pour la période 1997-2011 de la station de Aix-en-Provence située approximativement à la même altitude et latitude que le site expérimental de Barbentane et présentant le même contexte climatique méditerranéen.

### Diagramme ombrothermique (fig. 44 et 45)

On observe sur la figure 44, un pic de chaleur en juillet, supérieur aux moyennes d'Aix (fig. 45), mais ce fut également un mois avec de fortes pluies ce qui est inhabituel pour un climat de type méditerranéen. Les mois de juin et août apparaissent sec mais étant données les pluies importantes au printemps (également inhabituel pour un climat méditerranéen), le sol devait présenter une bonne réserve en eau (d'autant plus qu'il s'agit d'un ancien sol agricole, donc une profondeur et une réserve utile importantes). En somme, il apparaît que 2013 fut une année peu typique d'un climat méditerranéen, avec peu ou pas de sécheresse estivale.

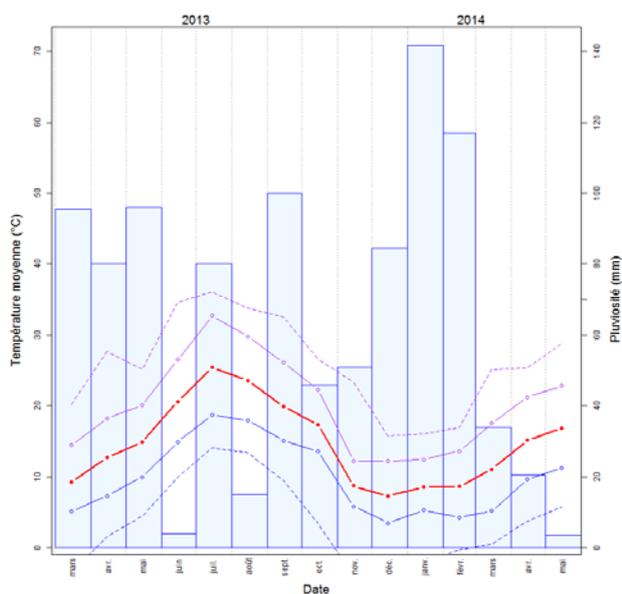


Figure 44 : Diagramme ombrothermique du site d'étude (Barbentane)

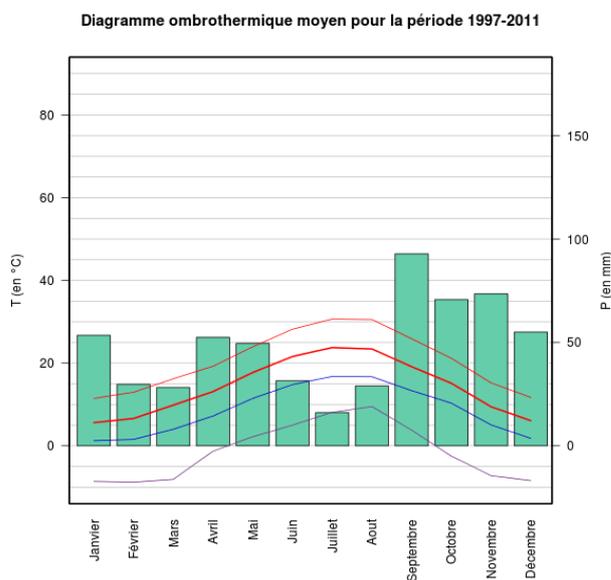


Figure 45 : Diagramme ombrothermique moyen (1997-2011) de la station météo d'Aix-en-Provence

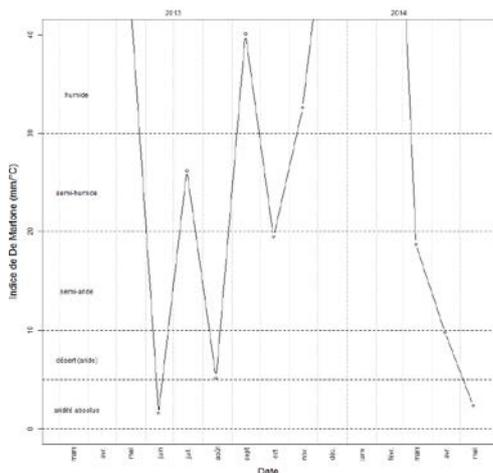
#### Légende :

- **Histogramme : pluviométrie mensuelle (en mm)**
- **Courbes : températures moyennes mensuelles**
  - Courbe rouge pleine = moyenne mensuelle des températures
  - Courbe violette pleine = température maximale journalière moyenne
  - Courbe violette pointillée = température maximale mensuelle
  - Courbe bleue pleine = température maximale journalière moyenne
  - Courbe bleu pointillée = température maximale mensuelle.

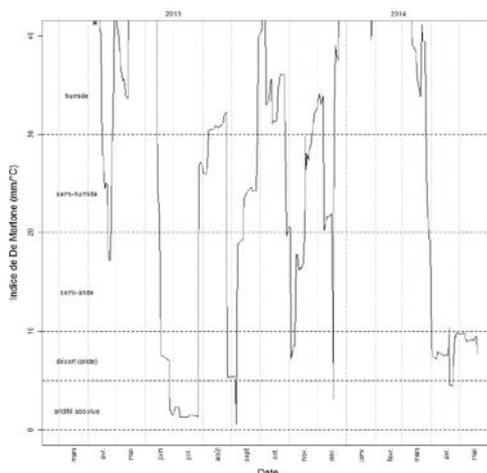
Lorsque la courbe rouge se trouve au-dessus de la pluviométrie, le mois est sec.

Indice De Martone (fig. 46 et 47).

L'indice mensuel De Martone confirme le diagramme ombrothermique. En revanche l'indice journalier apporte une plus-value d'information. Il apparait en réalité que les mois plus secs étaient juin et juillet. Cette période correspondant à l'organogenèse et l'allongement des UC 3 et 4, il serait intéressant de savoir si cette sécheresse atmosphérique a pu avoir un impact sur la croissance de ces UC (bien que le sol ait probablement encore une bonne réserve en eau à cette période).



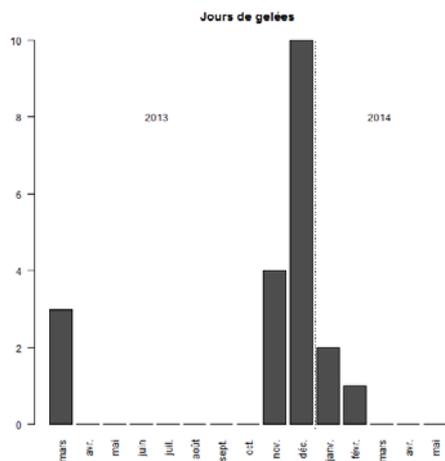
**Figure 46 : Indice d'aridité De Martone – mensuel (site d'étude)**



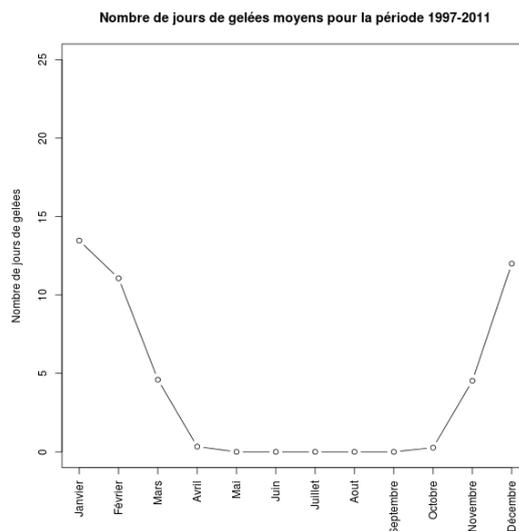
**Figure 47 : Indice d'aridité De Martone – journalier (site d'étude)**

Nombre de jours de gelée (fig. 48 et 49)

En comparaison avec les moyennes de la station d'Aix, le nombre de jours de gelée est classique pour un climat méditerranéen pour mars, novembre et décembre 2013. En revanche, il est très bas pour les mois de janvier et février 2014 sur la station de Barbentane.



**Figure 48 : Nombre de jours de gelées (site d'étude)**



**Figure 49 : Nombre de jours de gelées moyens (1997-2011) de la station météo d'Aix-en-Provence**

Finalement, il apparaît que la période mars 2013 – avril 2014 fut plus humide que la normale pour un climat méditerranéen, particulièrement au printemps 2013. Les épisodes de sécheresse indiqués par les indices De Martone en juin et juillet n’ont donc probablement pas eu un fort effet de stress hydrique, étant donné que le sol, ancienne friche agricole, devait avoir une bonne réserve en eau (la réserve utile du sol aurait d’ailleurs été intéressante à connaître). Par conséquent, la chronologie de la croissance du Pin d’Alep pourrait être différente de celle élaborée dans cette étude, dans le cas d’une année plus sèche.

A présent que l’ensemble des résultats de l’étude a été exposé, il est intéressant de voir si les objectifs de départ ont été atteints, les problèmes qu’il reste à élucider et la manière dont l’étude pourrait être approfondie et améliorée.

### 3 Discussion

La discussion se décline en trois parties : d’abord elle récapitule les réponses apportées aux problématiques de départ, puis elle étudie la manière dont on pourrait les enrichir et enfin, elle mentionne quelques points à améliorer sur l’étude développée dans ce rapport, qu’il serait intéressant de prendre en compte pour la suite.

#### 3.1 Bilan sur les résultats obtenus, déclinés par objectif de départ.

Les problématiques et objectifs de départ étaient les suivants :

1. Etablir une chronologie de l’allongement
2. Etablir une chronologie de l’organogenèse
3. Etudier les liens entre les deux chronologies :
  - Existe-t-il des périodes de simultanéité des deux processus ?
  - Est-ce que l’allongement empêche ou ralentit l’organogenèse ? Et inversement ?

Et nous pouvons rajouter les questions ci-dessous :

4. A quelle période l’arbre est-il le plus demandeur en énergie ?
5. Quels seraient les impacts potentiels du climat sur les différentes périodes de croissance ?

##### 1. Etablir une chronologie de l’allongement

La chronologie de l’allongement a effectivement pu être établie au moins pour les UC 1, 2 et 3, en termes de périodes d’activité et en termes d’intensité. Des éléments sont rassemblés pour l’UC4 mais les très nombreuses pertes, par attaque biotique sous le bourgeon terminal, sur les arbres suivis en allongement (environ 60 % des individus) ont diminué le nombre d’observations qui auraient permis de mieux comprendre la phénologie de cette dernière UC et par la même, la phase précoce d’allongement automnal de l’UC 1 de la pousse annuelle suivante. Il faut cependant rappeler que l’année d’étude correspond à une année plutôt humide pour un climat méditerranéen et que le sol est probablement propice à une bonne croissance. Cette chronologie de l’allongement pourrait donc être différente dans un autre contexte expérimental.

*N.B. : Les pertes ont essentiellement eu lieu à l’automne 2013 (car la tordeuse des pins piquent la pousse sous le bourgeon terminal soit au printemps en avril ou soit à l’automne) et n’ont donc pas empêché de bien comprendre la chronologie des UC 1, 2 et 3 avec la quasi-totalité des individus suivis depuis mars 2013 (voir annexe 8).*

## 2. Etablir une chronologie de l'organogenèse

Les résultats concernant la chronologie de l'organogenèse n'ont pu être aussi précis que pour l'allongement. Cependant, les périodes d'activité du méristème ont été établies de manière plus fiable que la chronologie de l'intensité de l'organogenèse.

Les périodes d'organogenèse des UC 1, 2 et 3 ont en effet bien été définies (à confirmer et préciser cependant avec l'analyse d'échantillons supplémentaires). Les résultats confirment une hypothèse avancée dans plusieurs recherches (Girard et al., 2011; Pardos et al., 2003; Vennetier et al., 2011) : les UC 1 et 2 sont préformées l'année précédant celle de leur allongement. En revanche, les deux UC complètes n'ont jamais été observées simultanément dans le même bourgeon, seules des portions de chacune ont pu être visualisées. Il semblerait que l'UC 1 commence à s'allonger alors que l'organogenèse de l'UC 2 n'est pas terminée. Elle reste cependant protégée pendant l'hiver par un fourreau des cataphylles séparées par des entre-nœuds courts.

L'organogenèse de l'UC 3 se fait plus rapidement que les deux autres, la base de cette UC serait préformée au printemps, puis néoformée lorsque l'organogenèse de sa partie terminale a lieu simultanément à l'allongement de sa partie basale (Rival, 1965). Quant à l'UC 4, nous n'avons pu avoir de certitude sur le fait qu'elle soit préformée ou pas, car elle peut être confondue avec la première UC de la pousse annuelle suivante. Nous émettons cependant l'hypothèse que son développement est similaire à celui de l'UC 3.

Il faudrait, pour lever les incertitudes concernant l'UC 4 :

- analyser les échantillons non traités de bourgeons et les comparer aux arbres suivis en allongement par les calculs de distances euclidiennes (même méthode que dans cette étude) ;
- resserrer le pas de temps de l'échantillonnage afin de voir un début et une fin de cette quatrième unité de croissance. Des analyses supplémentaires des échantillons récoltés en juillet 2013 pourraient également découvrir une fin d'organogenèse d'UC 4 (dans un bourgeon avec trois UC déjà allongées sur la pousse annuelle).

Ensuite, concernant l'intensité de l'activité méristématique, elle fut plus difficile à établir pour deux raisons : le pas de temps d'échantillonnage choisi (mensuel) est trop grand et trop peu d'observations ont été traitées par date.

Cependant, des facteurs endogènes, explicatifs des variations d'intensité de l'organogenèse, ont été identifiés :

- l'effet d'une compétition avec l'allongement ;
- le type d'UC en cours d'organogenèse (facteur probablement très corrélé avec le contexte dans lequel l'UC est créée : climat, compétition avec l'allongement, etc.) ;
- le stade d'avancement dans l'organogenèse d'une même UC.

Ces observations ne sont bien sûr valables que si l'on assume que les variations du volume méristématique, au cours d'une année, sont suffisamment plus grandes que celles au cours d'un plastochrone.

## 3. Liens entre les deux chronologies

L'étude des liens entre les deux chronologies peut se faire sous différents angles :

⇒ Existe-t-il des périodes de simultanéité des deux processus de croissance ?

L'organogenèse et l'allongement se font de manière simultanée sur quatre mois : avril, mai, juin et juillet. C'est-à-dire que l'organogenèse d'une UC est à cette période toujours simultanée à l'allongement d'une autre UC (organogenèse et allongement peuvent être simultanés pour la même UC sur juin et juillet).

La simultanéité de ces processus peut potentiellement aller jusqu'à neuf mois (commençant en mars et finissant en novembre) ; il est probable que ces mois supplémentaires de chevauchement des deux processus de croissance (mars, août, octobre et novembre) soient dépendants du taux de polycyclisme de la pousse annuelle.

⇒ Comment s'influencent les deux processus ?

Les résultats suggèrent assez clairement que l'accroissement de la pousse annuelle sous-jacente au bourgeon limite l'activité méristématique (régression linéaire, schéma bilan de la partie 2.2.3). En revanche, la réciproque n'est pas été mise en évidence.

En particulier, les résultats soulèvent l'hypothèse que lorsqu'une pousse annuelle ne met pas en place de quatrième unité de croissance, l'UC 1 de la PA suivante commence un allongement précoce à l'automne. Il se pourrait donc que dans le cas où une quatrième UC est mise en place, son allongement ralentisse l'avancée de l'organogenèse de l'UC 1 de la PA suivante, ce qui retarderait également son allongement (l'UC 1 étant préformée, son allongement ne se fait qu'une fois l'organogenèse achevée). Ces observations sont à confirmer sur un second cycle de végétation, en poursuivant le suivi dynamique d'allongement jusqu'en avril 2015.

A. Kremer (1981) émet l'hypothèse que le temps d'élongation de la dernière UC d'une pousse annuelle influence le début d'organogenèse de la première UC de la pousse annuelle suivante. Cette observation confirmerait l'hypothèse évoquée ci-dessus. Bien sûr, il est également important de prendre en compte les autres facteurs endogènes et exogènes susceptibles d'influencer la chronologie du développement de chaque UC (état de développement de l'arbre, climat, etc.).

#### 4. A quelle période l'arbre est-il le plus demandeur en énergie ?

Le Pin d'Alep est probablement le plus demandeur en énergie lorsque les deux processus de croissance sont simultanément les plus intenses, soit entre avril et juillet, cf. figure 26 (l'organogenèse est intense en été mais l'allongement est alors très faible).

#### 5. Quels seraient les impacts potentiels du climat sur les différentes périodes de croissance ?

La réponse à cette question centrale sur le sujet, exposée en introduction, sera développée *a posteriori* par l'étude des effets des variations intra-annuelles du climat sur la chronologie de la croissance. Les éléments sur lesquels il serait intéressant de travailler pourraient être :

- ⇒ Les effets éventuels du climat sur le début et la fin de l'organogenèse de chaque d'UC (temps thermique, cumul des précipitations), et en déduire un effet sur le taux de polycyclisme (le fait de mettre en place une quatrième UC ou non).
- ⇒ Les effets du climat sur l'allongement de ces différentes unités de croissance (de même avec le temps thermique et le cumul des précipitations).
- ⇒ Les effets du climat de l'année précédente (observables sur les résultats des suivis de 2014), liés à une mise en réserve de métabolites secondaires dans la plante ou d'eau dans le sol.
- ⇒ Les effets d'éventuels épisodes de stress observés durant le suivi (sécheresses, gelées, facteurs limitant l'évapotranspiration).

Différentes pistes d'études peuvent être trouvées dans la littérature scientifique. Par exemple, Owens & Marje (1977a) ont étudié les effets de la température sur l'organogenèse et l'allongement de la pousse annuelle de *Picea glauca* ou encore Guyon, Betored & Kremer (1987a) ont étudié les effets de la

température et des précipitation sur l'activité méristématique du Pin noir d'Autriche. Dans des études plus récentes, l'effet du temps thermique sur la croissance de la pousse annuelle de l'Epicéa commun a été étudié par Sutinen (2012) et sur celle du Pin sylvestre par Schiest-Aalto *et al.* (2013).

Avec les résultats obtenus dans cette première partie de l'étude, nous pouvons tout de même avancer l'hypothèse que des épisodes de stress seraient susceptibles d'affecter la croissance de la manière suivante :

- des sécheresses estivales en juin-juillet pourraient influencer le taux de polycyclisme en conditionnant l'organogenèse d'une quatrième unité de croissance ou en retardant celle de la première UC de la pousse annuelle suivante. Elles pourraient également affecter l'allongement des UC 3 et 4 ;
- les gelées de novembre ( $A_n$ ) à mars ( $A_{n+1}$ ), pourraient, elles, affecter l'organogenèse de l'UC 2 de la pousse  $A_{n+1}$ .

*N.B. : Les effets de la sécheresse ne seront cependant pas faciles à mettre en évidence pour 2013 et 2014 puisque ce sont des années humides pour un climat méditerranéen.*

#### Remarque :

Cette étude met en évidence qu'il y a, pour les mêmes paramètres environnementaux, une variabilité inter-individuelle de réponse en termes de croissance, qui pourrait témoigner d'un patrimoine génétique riche, offrant des possibilités d'adaptation à un climat changeant dans les générations futures. En l'occurrence, il pourrait être intéressant de mettre en place un nouveau protocole, avec par exemple des populations de Pin d'Alep d'origines contrastées, chacune soumise à un dispositif expérimental d'exclusion de pluies. Il serait alors possible d'étudier la part de l'identité génétique dans la réponse à des stress hydriques. La réponse de chaque population pourrait également être étudiée dans des stations naturelles différentes, présentant des intensités d'épisodes de sécheresse estivale distinctes.

Afin d'étayer les réponses apportées aux problématiques initiales, différents éléments du protocole peuvent être modifiés ou rajoutés, ils sont présentés dans la partie qui suit.

### **3.2 Propositions de protocoles pour approfondir l'étude.**

Les éléments du protocole actuel qu'il serait intéressant de faire évoluer peuvent se décliner en quatre catégories :

- Resserrer le pas d'échantillonnage sur des périodes cibles.
- Améliorer la lecture du taux d'activité méristématique.
- Approfondir les observations sur les axillaires à différents stades de développement.
- Etudier les liens entre le volume méristématique et la largeur de moelle.

Pour chacune des catégories, sont décrites les informations supplémentaires que pourraient apporter ces options de protocole.

- Resserrer le pas d'échantillonnage sur des périodes cibles

#### ○ *Avril à juillet*

Cette période d'étude est essentielle pour comprendre quels facteurs conditionnent le taux de polycyclisme (donc indirectement le potentiel adaptatif du Pin d'Alep à des changements climatiques). En effet, resserrer le pas de temps d'échantillonnage permettrait d'abord d'établir plus clairement la chronologie de la croissance des unités 3 et 4. Ensuite, les facteurs climatiques conditionnant le début et la fin de l'organogenèse de ces UC pourraient être étudiés. Par ailleurs, comprendre ce qui conditionne la période d'organogenèse de l'UC 4, c'est également appréhender ce qui conditionne le début d'organogenèse de l'UC1, donc de la pousse annuelle suivante.

Au cas où le pas d'échantillonnage serait encore trop lâche, comme la base des dernières UC de la pousse annuelle semble s'allonger en même temps que leur extrémité est créée par le méristème, il serait important de compter les axillaires déjà visibles sous l'endroit où l'on coupe le bourgeon et surtout de prendre des photos à la loupe binoculaire préalablement à la coupe.

○ *Août*

Resserrer le pas de temps d'échantillonnage en août permettrait de créer des catégories de volume méristématique au cours du plastochrone. Le mois d'août est plus propice à ce travail car c'est la période où le volume méristématique atteint des maxima (début d'initiation de l'UC 1) et il n'est pas limité par une compétition avec l'allongement.

Si le volume est mesuré de la même manière que dans cette étude, cela permettrait de catégoriser les bourgeons déjà analysés et de comparer les échantillons d'une même catégorie de plastochrone, ce qui serait plus rigoureux. Cette catégorisation sera également utile pour analyser plus d'échantillons de 2013 et les nouveaux de 2014.

○ *Octobre à décembre*

L'étude de cette période permettrait d'étudier deux choses :

- les facteurs qui induisent la formation des cônes. Il serait particulièrement intéressant d'étudier les effets du climat sur la formation des cônes, afin d'estimer les capacités reproductrices de l'espèce en cas de changement climatique. Cependant, il faut pour cela trouver un moyen précis d'identifier les cônes à l'état embryonnaire (voir ci-dessous la partie sur les axillaires) ;
- le moment où finit l'organogenèse de l'UC 1 et où commence celle de l'UC 2 qui n'a pas pu clairement être défini dans cette étude, au vu de la variabilité entre les échantillons.

○ *Janvier*

Ce mois pourrait correspondre à une phase de fin d'organogenèse de l'UC 2. Il serait donc également intéressant d'établir des catégories de plastochrone à cette période de l'année, afin de voir si elles sont comparables à celles d'août.

➤ Améliorer la lecture du taux d'activité méristématique

La première démarche à adopter pour faire évoluer le protocole en ce sens, est d'encore améliorer l'imprégnation en résine du méristème (extraire l'air qui reste emprisonné sous les écailles serrées au-dessus, et trouvé une solution pour diminuer la rigidité des écailles, cf. annexe 3).

Ensuite, une fois l'efficacité du protocole d'imprégnation assurée, il serait envisageable de faire des coupes plus fines sur des échantillons d'intérêt, dans le but d'affiner les mesures d'activité méristématique. La mesure de l'activité pourrait par exemple se faire par une reconstitution numérique du méristème en trois dimensions (coupes de 1  $\mu\text{m}$ ).

Un indice mitotique pourrait également être calculé (nombre de cellules en division / nombre de cellules en interphase), de préférence s'il existe un moyen de le rendre comparable d'un échantillon à l'autre, à tout moment du plastochrone. La meilleure coloration pour estimer cet indice serait de l'hématoxyline, testée en début de stage.

*N.B. : Cet indice pourrait être estimé sur les coupes déjà faites, pour lesquelles le méristème est bien visible (les lames sont identifiées pour chaque photo). Les lames concernées peuvent être colorées à l'hématoxyline (cf. annexe 3) et prises en photo à plus fort grossissement. Ces nouvelles données permettraient de voir si l'indice mitotique varie de la même manière que le volume méristématique, ce qui confirmerait alors les observations de cette étude.*

Une toute autre méthode pourrait également servir à étudier l'activité du méristème, en s'abstrayant des variations de formes du méristème au cours d'un plastochrone : l'observation du méristème en trois

dimensions, vu du dessus avec un microscope électronique à balayage. Une formule mathématique développée par J.P. Guyon et A. Kremer (Guyon et al., 1987a), permet de calculer la durée d'un plastochrone à un instant t, sans avoir besoin d'observations échelonnées au cours du temps. Cette formule est basée sur l'arrangement des primordia et ébauches par rapport à la pointe du dôme méristématique, observé du dessus.

Enfin, un dernier élément relié à l'activité méristématique, que l'on trouve dans la littérature scientifique, est la nature et la quantité des réserves accumulées sous le méristème à différents moments de l'année. M-N. Jordy (2004) étudie avec différentes colorations l'accumulation au cours du temps de l'amidon, des tannins et des lipides sous le méristème.

➤ Approfondir les observations sur les axillaires à différents stades de développement.

Les résultats de la partie 2.2.5 sur les densités d'axillaires (p.50-51), suggèrent que les axillaires arrivent plus vite à maturité au printemps, lorsqu'ils sont sur des UC courtes. Il serait donc intéressant d'étudier les paramètres qui influencent la maturité des axillaires et la compétition qu'elle serait susceptible d'imposer à l'activité méristématique. Pour cela, l'échantillonnage resserré entre avril et juillet est encore une fois important.

Plus généralement, la maturation des organes, à l'état embryonnaire, puis leur croissance après l'ouverture du bourgeon, constituerait un phénomène à étudier dans ses relations avec la croissance de l'axe d'ordre 1. Une typologie du stade phénologique des unités de croissance sous-jacentes au bourgeon a été mise en place dans le protocole utilisé pour cette étude, mais cette donnée est peu fiable car elle a été relevée par un nombre trop élevé d'observateurs différents. Il n'est pas certain que la notation entre les observateurs soit homogène. A l'avenir, il serait tout de même préférable d'utiliser cette typologie (après avoir étalonné les observateurs), basée sur les brachyblastes, et éventuellement de la développer avec des mesures de longueur d'aiguille, de longueur de branches et de taille des cônes par exemple.

*N.B. 1 : Des critères tels que le nombre d'écaille à la base des brachyblastes ou des branches pourraient également être intéressants en termes d'indicateurs du temps de dormance de leur propre méristème.*

*N.B. 2 : Dans le bourgeon, il semblerait que la moelle est plus lâche (plus d'aérenchyme) lorsque les axillaires embryonnaires sont proches de leur maturité. Il y aurait peut-être là un indicateur supplémentaire.*

Pour finir, étant donné que nous avons rencontré des difficultés à identifier les auxiblastes (rameaux courts ou longs) à l'état embryonnaire dans le bourgeon, il serait intéressant de développer des techniques pour améliorer l'identification. Plusieurs options sont à étudier :

- colorations de certains tissus différenciés tôt et particuliers aux auxiblastes et/ou aux cônes femelles ;
- étude précise de la forme des méristèmes des différents types d'axillaires à l'état embryonnaire (Sacher, 1954, 1955).

Une bonne connaissance du nombre moyen d'axillaires par type d'UC (en comptant les organes sur les UC allongées), aiderait également à cibler les bourgeons susceptibles de renfermer des rameaux ou des cônes et à travailler à la reconnaissance de ces derniers à l'état embryonnaire.

➤ Etudier les liens entre le volume méristématique et la largeur de moelle.

De nombreuses mesures de largeur de moelle ont été prises sur les coupes photographiées mais nous n'avons pas eu le temps de travailler sur ces données. Par ailleurs, les mesures ont été prises à une distance aléatoire du méristème, or il serait intéressant de les prendre à distance fixe et relativement proche du méristème. Cela permettrait d'avoir des mesures comparables entre elles et sur une moelle la plus intègre et nouvellement générée possible. Il a été mis en évidence (Buissart, 2012) que le diamètre de moelle diminuait avec la succession des UC. Une hypothèse forte est que la taille de la moelle correspond à la taille du

méristème primaire. Il serait donc intéressant de la vérifier en analysant les relations entre la taille de la moelle et le volume méristématique.

À présent que nous avons révisé les différents protocoles qu'il serait intéressant d'envisager pour approfondir l'étude, il est important de rappeler les éléments qui manquaient aux premières recherches exposées dans ce rapport, afin de trouver des moyens d'y pallier.

### 3.3 Critiques sur le protocole actuel

L'un des regrets majeurs vis-à-vis des résultats de cette étude fut de ne pouvoir observer d'ébauches de cônes femelles dans les bourgeons. En effet, cette donnée était importante d'une part pour différencier les pousses annuelles successives (les cônes sont en général seulement présents sur la première UC d'une pousse annuelle et jamais sur la troisième ou la quatrième, Vennetier *et al.*, 2011), et d'autre part pour étudier *a posteriori*, les impacts du climat sur les capacités de reproduction du Pin d'Alep. Plusieurs raisons sont envisageables pour expliquer le fait qu'on n'ait pu observer d'ébauches de cônes femelles :

- les cônes étant disposés sur un pseudoverdricille, il est possible qu'ils ne soient pas apparus dans le plan de coupe ;
- les cônes ne se différencient pas suffisamment tôt pour être reconnus morphologiquement dans le bourgeon. En l'occurrence, Owens & Marje (1975, 1977b) ont mis en évidence que chez *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière 1855 et *Abies amabilis* (Dougl. ex Loud.) Dougl. ex Forbes 1839, les ébauches de cônes ne se différencient qu'à la fin de l'organogenèse de la série de cataphylles de l'UC suivante. Cependant, chez le Sapin et l'Epicéa, les cônes apparaissent en position interverticillaire, il est donc possible que le moment de différenciation de leurs cônes soit différent de celui du Pin d'Alep ;
- le grossissement du microscope n'était pas suffisamment important pour être en mesure de les reconnaître. Dans Owens (2006), les illustrations de la page 8 (figures 12 et 13 du document) montrent que les ébauches de cônes du *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. 1838 sont dix fois plus petites que celles des rameaux longs. Si une telle différence est également observable chez le Pin d'Alep, il est alors probable que nous n'ayons pu identifier les cônes en raison d'un trop faible grossissement (bien que plusieurs coupes susceptibles d'en présenter aient été longuement observées au microscope, avec plusieurs objectifs).

Un autre regret fut de ne pas avoir systématiquement, pour chaque bourgeon récolté, une photo (avec une échelle) de l'UC sous-jacente dans sa totalité avec le bourgeon à son extrémité (comme dans la figure 8 du rapport), une photo du bourgeon avant d'être écaillé et une photo du bourgeon après avoir été écaillé. Ces documents auraient été utiles pour lever des doutes sur certains échantillons pour lesquels les données du MTG (analyse rétrospective) étaient ambiguës. Par exemple, pour différencier l'UC 4 de l'UC 1 de la pousse annuelle suivante ou encore visualiser l'allongement de la base des UC néoformées.

Enfin, pour aider à la lecture d'une chronologie de l'organogenèse, il aurait été utile de sélectionner, pour une même date, des bourgeons — parmi les 10 échantillonnés aléatoirement — dont les pousses annuelles sous-jacentes étaient similaires (même taux de polycyclisme, traits morphologiques des UC similaires). Cependant, la diversité d'observations dans cette étude était intéressante pour appréhender la variabilité inter-individuelle des individus. Cette proposition est bien entendue toujours faisable, en utilisant les échantillons de 2013 qu'il reste pour chaque date de prélèvement.

## Conclusion

Cette étude porte sur une thématique peu étudiée jusqu'à présent : la chronologie des deux processus de la croissance primaire, chez une espèce polycyclique et en contexte climatique méditerranéen. L'organogenèse en particulier, a très peu été abordée chez des essences comparables au Pin d'Alep, en termes de croissance et d'aire de répartition. L'originalité de cette étude la donne une nature exploratoire. Son rôle est de poser les bases des recherches dont l'objectif serait de comprendre en quoi le polycyclisme constitue un potentiel adaptatif à une augmentation de l'intensité des épisodes de stress climatiques.

Le travail réalisé a abouti à la proposition d'une chronologie de la croissance de la pousse annuelle du tronc, chez de jeunes Pins d'Alep. Cette chronologie est déclinée par unité de croissance, dont l'organogenèse et l'allongement sont représentés séparément. De plus, pour chaque processus de croissance, les variations de leur intensité au cours de l'année ont été étudiées, en plus de leurs périodes d'activité. Il est néanmoins important de préciser que, pour cette étude, les observations correspondent à une année relativement humide pour un climat méditerranéen.

Les trois premières UC sont celles pour lesquelles les résultats sont les plus robustes :

- l'UC 1 se préforme le plus souvent entre la fin d'été et le début de l'automne de l'année n-1, et s'allonge au printemps suivant ;
- l'UC 2 se préforme après l'UC1, pendant l'automne et l'hiver (elle continue sa maturation dans le bourgeon jusqu'en avril) et s'allonge l'année suivante du printemps jusqu'au début de l'été, simultanément à l'UC 1 ;
- l'UC 3 montre une partie préformée en mai, et une partie néoformée en juin et juillet lors de son allongement. Cette unité de croissance poursuit son allongement jusqu'à la fin de l'été.

Des observations ont été faites et sont à confirmer quant à la chronologie de la croissance d'une éventuelle quatrième UC : cette dernière se formerait en juin ou en juillet et s'allongerait entre les mois de juillet et de septembre (probablement préformée en juin, puis néoformée en juillet). Par ailleurs, un début d'allongement précoce de l'UC 1 de la pousse de l'année n, a souvent été observé à l'automne de l'année n-1. La date de début d'allongement de la pousse annuelle pourrait avoir un lien avec la date de fin de croissance de la pousse annuelle précédente.

En termes d'intensité, les maxima sont atteints, pour les deux processus, sur la croissance de l'UC 1 et de l'UC 2 : le nombre de millimètres allongés par jour à la pousse annuelle est maximal entre mars et juillet (allongement des deux premières UC) et le volume méristématique présente des maxima entre août et décembre (période d'organogenèse des mêmes UC, l'année précédant leur allongement). A l'opposé, l'intensité de la croissance est minimale entre novembre et février pour l'allongement, et entre janvier et mars pour l'organogenèse (selon le volume méristématique). De plus, il semblerait que l'organogenèse soit plus intense au moment de l'initiation des premiers rameaux nains porteurs d'aiguilles (les brachyblastes), toutes UC confondues. Par ailleurs, si l'on compare les deux processus de la croissance, il semblerait que le fort allongement de la pousse annuelle au printemps exerce une pression sur l'organogenèse, qui n'atteint alors pas les maxima d'intensité observés en été.

Les résultats concernant l'organogenèse restent cependant à confirmer car ils sont basés sur peu d'observations et un pas de temps d'échantillonnage trop grand pour pouvoir capter finement les variations du volume méristématique.

La prochaine étape sera d'étudier les effets des variations climatiques intra-annuelles sur les différents moments de la chronologie. Une fois le suivi sur deux ans terminé (en mars 2015), il sera également intéressant d'étudier les effets du climat de l'année précédant l'allongement des pousses.

Ensuite, il serait bénéfique à l'étude d'améliorer les indicateurs de l'intensité de l'organogenèse. Cela peut être fait en modifiant le protocole actuel :

- travailler à une meilleure imprégnation de la résine pour faire des coupes plus fines et reconstituer le méristème en trois dimensions ;
- faire des colorations adaptées et relever un indice mitotique ;
- resserrer le pas de temps d'échantillonnage en été afin d'étalonner les variations de volume méristématique sur un plastochrone.

Des techniques d'analyse différentes, comme l'utilisation d'un microscope électronique à balayage, pourraient également être envisagées.

De manière générale, les résultats sont à confirmer avec une augmentation du nombre d'observations (en particulier pour l'organogenèse), et à préciser par des études se focalisant sur des fenêtres de temps plus petites avec un pas d'échantillonnage adapté. Ces études supplémentaires permettront par exemple de préciser la chronologie de la croissance des dernières UC printanières de la pousse annuelle.

A présent qu'une proposition de la chronologie de la croissance polycyclique du Pin d'Alep a été faite, les perspectives de l'étude sont de comprendre quels facteurs seraient susceptibles d'influencer cette chronologie. De nouveaux protocoles peuvent être pensés sur le même site expérimental, afin d'étudier les questions suivantes :

- Quels sont les facteurs endogènes de la plante, susceptibles d'influencer la croissance des différentes UC ?
  - o Mieux comprendre l'influence de l'allongement d'une UC sur l'organogenèse d'une autre et inversement.
  - o Evaluer si la maturation des productions axillaires exerce une compétition sur la croissance en longueur des pousses. Et si certains axillaires sont plus compétitifs que d'autres (cônes femelles et cônes mâles).
  - o Evaluer si la croissance secondaire du tronc (croissance radiale ou en diamètre) exerce une compétition sur sa croissance primaire.
- Quels sont les facteurs exogènes susceptibles d'influencer la croissance des différentes UC ?
  - o Travailler à plus long terme sur les variations interannuelles du climat, par exemple en termes de mises en réserve de métabolites secondaires dans le végétal ou d'utilisation des réserves en eau du sol.
  - o Rajouter des dispositifs expérimentaux, comme une zone d'exclusion des pluies, pour évaluer l'effet de stress hydriques importants.

Par ailleurs, étant donné que cette étude comporte un travail sur la reconnaissance des productions axillaires à l'état embryonnaire, il serait intéressant de l'utiliser pour étudier les impacts du climat sur la quantité et la qualité des productions axillaires, pour chaque rang d'unités de croissance.

Finalement, comprendre les facteurs susceptibles d'influencer la chronologie de la croissance primaire du tronc chez le Pin d'Alep, donne des pistes pour appréhender le potentiel adaptatif que confère une croissance polycyclique à certaines essences méditerranéennes. A long terme, ces recherches permettraient d'améliorer la gestion des forêts du sud-est de la France, de maintenir une diversité du couvert forestier et d'assurer la protection des sols, sous un climat que l'on prédit plus aride dans les années à venir.

## Bibliographie citée

- Barthélémy, D., & Caraglio, Y. (2007). Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. *Annals of Botany*, 99(3), 375–407. doi:10.1093/aob/mcl260
- Barthélémy, D., Caraglio, Y., & Costes, E. (1997). Architecture , gradients morphogénétiques et âge physiologique chez les végétaux.
- Barthelemy, D., Caraglio, Y., & Sabatier, S. (2000). Architecture analysis : a tool for tree life history knowledge. In *Adaptation and selection of mediterranean Pinus and Cedrus for sustainable afforestation of marginal lands - Proceedings of the Final Conference of the European Union Joint Research Project FAIR CT 95 - 00 97* (pp. 27–44).
- Brice, F. (2011). *Les mots de la botanique* (Actes Sud.).
- Buissart, F. (2012). *Mémoire de stage : Climat et variabilité interspécifique de la croissance annuelle chez les pins d 'Alep ( Pinus halepensis Mill subsp. halepensis) et de Calabre (Pinus halepensis Mill. subsp. brutia (Ten.) E.Murray)*.
- Debazac, E. F. (1962). Morphologie et sexualité chez les pins. *Revue Forestière Française*, 293–303.
- Debazac, E. F. (1966). I.- Développement de la ramification. Les modalités de la croissance en longueur chez les Pins. In C. N. F. . Station d'Ecologie Forestière (Ed.), *Colloque sur la physiologie de l'arbre, 1966*. Nancy.
- Esteban, L. G., Martin, J. A., De Palacios, P., Fernandez, F. G., & Lopez, R. (2010). Adaptive anatomy of *Pinus halepensis* trees from different Mediterranean environments in Spain. *Trees*, 24, 19–30. doi:10.1007/s00468-009-0375-3
- Girard, F., Vennetier, M., Guibal, F., Corona, C., Ouarmim, S., & Herrero, A. (2012). *Pinus halepensis* Mill. crown development and fruiting declined with repeated drought in Mediterranean France. *European Journal of Forest Research*, 131(4), 919–931. doi:10.1007/s10342-011-0565-6
- Girard, F., Vennetier, M., Ouarmim, S., Caraglio, Y., & Misson, L. (2011). Polycyclism, a fundamental tree growth process, decline with recent climate change: the example of *Pinus halepensis* Mill. in Mediterranean France. *Trees*, 25(2), 311–322. doi:10.1007/s00468-010-0507-9
- Godin, C., & Caraglio, Y. (1998). A Multiscale Model of Plant Topological Structures. *Journal Theoretical Biology*, 191, 1–46.
- Guyon, J. P., Betored, D., & Kremer, A. (1987a). Influence de la température et des précipitations sur l'activité de méristème apical dans une régénération naturelle de Pin noir d'Autriche (*Pinus nigra* Arn. ssp. *nigricans* Host) - 1ère partie. *Acta OEcologica*, 8 (22), 309–315.
- Guyon, J. P., Betored, D., & Kremer, A. (1987b). Influence de la température et des précipitations sur l'activité de méristème apical dans une régénération naturelle de Pin noir d'Autriche (*Pinus nigra* Arn. ssp. *nigricans* Host) - 2ème partie. *Acta OEcologica*, 8 (22), 316–320.
- Hallé, F., Oldeman, R., & Tomlinson, P. (1978). *Tropical trees and forest*. Springer Verlag, 441.
- Jordy, M.-N. (2004). Seasonal Variation of Organogenetic Activity and Reserves Allocation in the Shoot Apex of *Pinus pinaster* Ait. *Annals of Botany*, 93, 25–37. doi:10.1093/aob/mch005

- Kremer, A. (1981). Déterminisme génétique de la croissance en hauteur du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) I. - Rôle du polycyclisme. *Annals of Science Forestry*, 38 (2), 199–222.
- Owens, J. N. (2006). *The Reproductive Biology of Lodgepole Pine* (pp. 6–14).
- Owens, J. N., & Marje, M. (1973). Development of long-shoot terminal buds of *Pinus contorta* spp. *contorta*.
- Owens, J. N., & Marje, M. (1975). Bud development in Sitka spruce. I. Annual growth cycle of vegetative buds and shoots. *Canadian Journal of Botany*, 54, 313–325.
- Owens, J. N., & Marje, M. (1977a). Bud development in *Picea glauca*. I. Annual growth cycle of vegetative buds and shoot elongation as they relate to date and temperature sums. *Canadian Journal of Botany*, 55, 2728–2745.
- Owens, J. N., & Marje, M. (1977b). Vegetative bud development and cone differentiation in *Abies amabilis*. *Canadian Journal of Botany*, 55, 922–1008.
- Pardos, M., Climent, J., Gil, L., & Pardos, J. A. (2003). Shoot growth components and flowering phenology in grafted *Pinus halepensis* Mill. *Trees - Structure and Function*, 17(5), 442–450. doi:10.1007/s00468-003-0259-x
- Prévosto, B., Ripert, C., Monnier, Y., Corbani, A., Estève, R., & Diaye, A. N. (2009). *Valorisation forestière des terres à bonnes potentialités : plantation mélangée expérimentale pin d 'Alep et chênes*.
- Rival, P. (1965). Essai sur la croissance des arbres et sur leurs systèmes de floraison (application aux espèces fruitières). *Journal D'agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*, 12, 655–686.
- Sacher, J. A. (1954). Structure and seasonal activity of the shoot apices of *Pinus lambertiana* and *Pinus ponderosa*. *American Journal of Botany*, 41, 749–759.
- Sacher, J. A. (1955). Dwarf shoot ontogeny in *Pinus lambertiana*. *American Journal of Botany*, 42, 784–793.
- Schiestl-Aalto, P., Nikinmaa, E., & Makela, A. (2013). Duration of shoot elongation in Scots pine varies within the crown and between years. *Annals of Botany*, 112, 1181–1191. doi:10.1093/aob/mct180
- Sutinen, S., Partanen, J., Viherä-Aarnio, A., & Häkkinen, R. (2012). Development and growth of primordial shoots in Norway spruce buds before visible bud burst in relation to time and temperature in the field. *Tree Physiology*, 00, 987–997. doi:10.1093/treephys/tps063
- Taugourdeau, O., Dauzat, J., Griffon, S., Sabatier, S., Caraglio, Y., & Barthélémy, D. (2012). Retrospective analysis of tree architecture in silver fir (*Abies alba* Mill.): ontogenetic trends and responses to environmental variability. *Annals of Forest Science*, 69(6), 713–721. doi:10.1007/s13595-012-0188-1
- Team, R. D. C. (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria, (01/19).
- Thabeet, A., Vennetier, M., Gadbin-henry, C., Denelle, N., Roux, M., Caraglio, Y., & Vila, B. (2009). Response of *Pinus sylvestris* L. to recent climatic events in the French Mediterranean region. *Trees - Structure and Function*, 23, 4, 843–853.
- Vennetier, M., Girard, F., Didier, C., Ouarmim, S., Ripert, C., Misson, L., ... Martin, W. (2011). Adaptation phénologique du pin d 'Alep au changement climatique. *Forêt Méditerranéenne*, t.XXXII, n°2, 151–166.

Vennetier, M., Girard, F., Taugourdeau, O., Cailleret, M., Caraglio, Y., Sabatier, S.-A., ... Thabeet, A. (2012). Climate change impact on tree architectural development and leaf area. *Climate Change, InTech, Rijeka*, (5), 1–14.

## Bibliographie supplémentaire consultée

- Bouchon, J. (1993). *Architecture des arbres fruitiers et forestiers* (INRA Editi., pp. 305–323). Montpellier.
- Lanner, R. M. (1976). Patterns of shoot development in Pinus and their relationship to growth potential. In M. G. R. Cannell (Ed.), *Tree Physiology and yield improvement - Conference on physiological genetics of forest tree yield- 1975, Gorebridge* (pp. 223–243). Academic Press London.
- Montserrat-Marti, G., Camarero, J. J., Palacio, S., Perez-Rontomé, C., Milla, R., Albuixech, J., & Maestro, M. (2009). Summer-drought constrains the phenology and growth of two coexisting Mediterranean oaks with contrasting leaf habit: implications for their persistence and reproduction. *Trees*, 23, 787–799.
- Owens, J. N. (n.d.). The reproductive cycle of Douglas Fir. In *The reproductive cycle of Douglas fir* (Pacific Fo.). Victoria B.C.
- Owens, J. N. (1984a). Bud development in grand fir (*Abies grandis*). *Canadian Journal of Botany*, 14, 575–588.
- Owens, J. N. (1984b). Interaction between gibberellin A4/7 and root-pruning on the reproductive and vegetative processes in Douglas-fir. III. Effects on anatomy of shoot elongation and terminal bud development. *Canadian Journal of Botany*, 15, 354–364.
- Owens, J. N. (1985). Interaction between gibberellin A4/7 and root-pruning on the reproductive and vegetative processes in Douglas-fir. IV. Effects on lateral bud development. *Canadian Journal of Botany*, 16, 211–221.
- Owens, J. N., & Marje, M. (1979). Bud development in *Larix occidentalis*. I. Growth and development of vegetative long shoot and vegetative short shoot buds. *Canadian Journal of Botany*, 57, 687–700.
- Poyatos, R., Aguadé, D., Galiano, L., Mencuccini, M., & Martínez-Vilalta, J. (2013). Drought-induced defoliation and long periods of near-zero gas exchange play a key role in accentuating metabolic decline of Scots pine. *The New Phytologist*, 200(2), 388–401. doi:10.1111/nph.12278
- Prévosto, B. (2013). *Le pin d'Alep en France* (Editions Q.).
- Riou-Nivert, P. (1996). *Les résineux - Tome I : Connaissance et reconnaissance* (Institut p., pp. 190–191). Paris.
- Sabatier, S., Barthélémy, D., & Ducousso, I. (2003). Periods of organogenesis in mono- and bicyclic annual shoots of *Juglans regia* L. (Juglandaceae). *Annals of Botany*, 92(2), 231–238. doi:10.1093/aob/mcg127
- Zhang, H., Horgan, K. J., Reynolds, P. H. S., & Jameson, P. E. (2003). Cytokinins and bud morphology in *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 117, 264–269.

## **Table des annexes**

Annexe 1 : Protocole des suivis mensuels sur le site d'étude.....	68
Annexe 2 : Diversité de tailles et de formes de méristèmes dans le monde végétal .....	72
Annexe 3 : Récapitulatif méthodologique .....	73
Annexe 4 : Protocoles de traitement des bourgeons.....	80
Annexe 5 : Distances euclidiennes – Extrait de matrice.....	90
Annexe 6 : Illustrations de la typologie des productions axillaires. ....	92
Annexe 7 : Tableau d'entrée de l'ACP - Extrait des six premières lignes .....	101
Annexe 8 : Allongement et accroissement de la pousse annuelle – résultats pour tous les individus suivis. ....	102

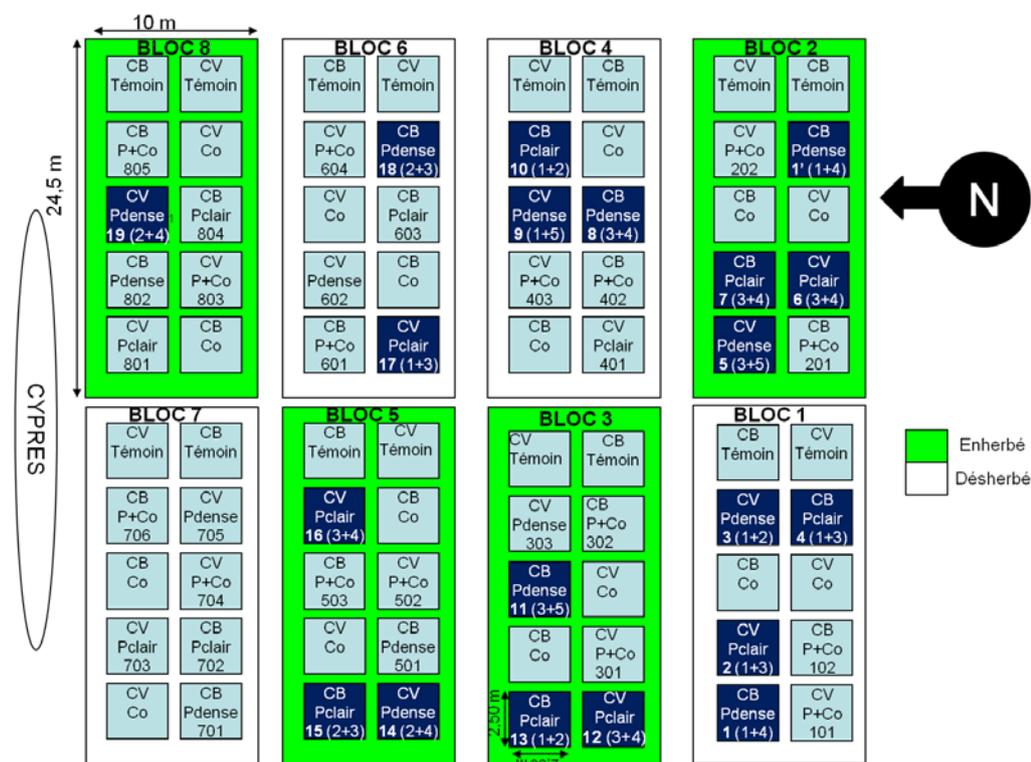
# Annexe 1 : Protocole des suivis mensuels sur le site d'étude

## Protocole de Barbantane

### Objectif du suivi

Améliorer les connaissances sur la phénologie du Pin d'Alep, en lien avec l'organogénèse, en particulier celle des pièces sexuelles

### Plan de la parcelle

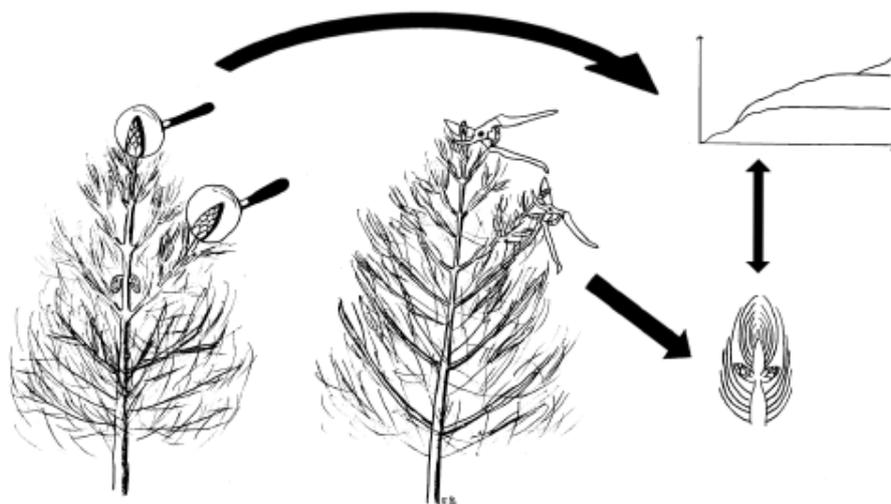


Coordonnées : 43,886634°N 4,74628°E

### Description

Le suivi s'effectue dans chacune des vingt placettes de couleur sombre, numérotées de 1 à 19 (+1' ou 0). Dans chacune de ces placettes deux individus ont été sélectionnés et numérotés. Le numéro des individus sélectionnés est reporté sur le plan entre parenthèses. Sur ces individus, le suivi s'effectue sur la tige principale (le tronc) ainsi que sur une ramification vigoureuse portée par la dernière unité de croissance (UC) de 2010. La branche sélectionnée est repérée sur le terrain par un trait rouge. Les pousses de 2010 à 2012 ont été décrites sur le tronc en décembre 2012 ou en janvier 2013. Les pousses de 2011 et 2012 sur la branche ont été décrites en mars 2013. Chaque mois l'état de la pousse de 2013 du tronc et de la branche sera relevé.

En outre, chaque mois 10 individus d'une modalité Pin dense et 10 individus d'une modalité Pin clair seront sélectionnés sur tout le dispositif. De la même manière le travail s'effectuera sur le tronc et sur une branche vigoureuse portée par la dernière UC de 2010. Sur le tronc et la branche ainsi sélectionnés seront relevés l'état des pousses de 2011 et de 2012 ainsi que le stade phénologique de la pousse de 2013. Sur chacun de ces axes choisis, le bourgeon sera coupé. La collection de bourgeons coupés permettra d'obtenir des informations sur les pièces préformées au sein du bourgeon et sur le taux de division cellulaires au cours du temps.



## Procédé

### Matériel à préparer

Pour suivre ce dispositif, il est nécessaire d'amener sur le terrain :

- Un escabeau
- Un sécateur
- Une règle (au moins 20 cm)
- Un crayon de bois
- Un marqueur
- Un lot de 10 étiquettes pour les branches
- Un carnet pour écrire les mesures
- Un support de saisie (planchette)
- Un ordinateur de terrain (si possible, pour la saisie)
- Un lot de 20 sachets pour récupérer les bourgeons

### Sur le terrain

La démarche à suivre est la suivante pour le suivi phénologique :

1. Repérer chaque placette à mesurer
2. Sur chacune des placettes, repérer les arbres à mesurer
3. Mesurer l'état de la pousse 2013 sur le tronc puis sur la branche. Pour cela il faudra d'abord repérer le nombre d'UC, puis pour chacune des UC mesurer :
  - o Sa longueur en cm
  - o Le nombre de ramifications (les cônes sont comptés séparément)
  - o Le nombre de ramifications mortes, sèches ou tombées
  - o Le nombre de cônes
  - o Le stade phénologique de l'UC (voir la section correspondante en page 71)
  - o Si une UC porte un cône, mesurer sa longueur en cm et son stade phénologique (voir la section correspondante en page 71)

Pour la récolte des bourgeons, la démarche est la suivante :

1. Parcourir chacune des placettes à mesurer
2. Sélectionner 1 individu non numéroté par placette (s'il est impossible de trouver un individu non numéroté sur une placette, alors choisir un individu non numéroté sur une placette voisine)
3. Mesurer l'état des pousses 2011, 2012 et 2013 sur le tronc. Pour cela il faudra d'abord repérer le nombre d'UC, puis pour chacune des UC mesurer :

- Sa longueur en cm
  - Le nombre de ramifications (les cônes sont comptés séparément)
  - Le nombre de ramifications mortes, sèches ou tombées
  - Le nombre de cônes
  - Le stade phénologique de l'UC (voir la section correspondante en page 71)
  - Si une UC porte un cône, mesurer sa longueur en cm et son stade phénologique (voir la section correspondante en page 71)
4. Récolter le bourgeon terminal (ne pas couper à raz du bourgeon pour limiter le dessèchement)
  5. Repérer la dernière UC de 2010 (il s'agit de la dernière UC, donc elle est *a priori* courte ; la première UC de 2011, qui lui succède, devrait porter un nombre significatif d'aiguilles alors que la dernière pousse de 2010 devrait être nue)
  6. Choisir une branche vigoureuse portée par cette UC
  7. Mesurer l'état des pousses 2011, 2012 et 2013 sur cette branche, de la même manière qu'à l'étape 3
  8. Récolter le bourgeon terminal

Lors de la prise de mesure, il est important de renseigner le bloc et la modalité. Les arbres sont numérotés PAyyymmnn, avec yy un numéro à deux chiffres correspondant à l'année de la mesure, mm un numéro à deux chiffres correspondant au mois de la mesure et nn un numéro à deux chiffres correspondant à un numéro d'ordre. Les arbres suivis en permanences ayant été mesurés fin 2012 - début 2013, ils portent un numéro de type PA1200nn. Ainsi, sur la placette 1, les arbres suivis en permanence (1 et 4) seront notés PA120001 et PA120004. Pour la mesure du mois de mars 2013, le premier arbre ayant servi au prélèvement de bourgeon sera noté PA130301, le dixième sera noté PA130310.

### De retour du terrain

Renseigner les mesures en MTG sur le fichier BDD-barbentane-yyyy-mm-dd.xlsx (adapter yyy, mm et dd pour correspondre à la date d'enregistrement du fichier). Pour les individus suivis en permanence, si la pièce mesurée existait déjà lors de la dernière campagne de mesure, il faut alors ajouter une ligne et mettre une '\*' au lieu de la topologie. Penser à bien préciser la date.

Ainsi, si par exemple la dernière mesure enregistrée pour l'individu PA120004 sur la placette en cours était la suivante :

ENTITY-CODE	Date	Year	Length	Nramif	Ndead	Ncone	Pheno	Author
/PA120004	17/01/2013							
^/Axis0	17/01/2013							
^/AS2010	17/01/2013	2010						
^/GU1	17/01/2013	2010	45	4			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2010	21	3			7	FB+FG
^<GU3	17/01/2013	2010	14	2			7	FB+FG
^<AS2011	17/01/2013	2011						
^/GU1	17/01/2013	2011	36	3			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2011	19	4			7	FB+FG
^<AS2012	17/01/2013	2012						
^/GU1	17/01/2013	2012	49	2			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2012	19	2			7	FB+FG
^<GU3	17/01/2013	2012	11	3			6.5	FB+FG
^<AS2013	17/01/2013	2013						
^/GU1	17/01/2013	2013	1.8	1			4	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2013					2	FB+FG

Si je souhaite renseigner une nouvelle mesure pour la date du 20/05/2013 avec 3 UC, il faudra faire ainsi :

ENTITY-CODE	Date	Year	Length	Nramif	Ndead	Ncone	Pheno	Author
/PA120004	17/01/2013							
^/Axis0	17/01/2013							
^/AS2010	17/01/2013	2010						
^/GU1	17/01/2013	2010	45	4			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2010	21	3			7	FB+FG
^<GU3	17/01/2013	2010	14	2			7	FB+FG
^<AS2011	17/01/2013	2011						
^/GU1	17/01/2013	2011	36	3			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2011	19	4			7	FB+FG
^<AS2012	17/01/2013	2012						
^/GU1	17/01/2013	2012	49	2			7	FB+FG
^<GU2	17/01/2013	2012	19	2			7	FB+FG
^<GU3	17/01/2013	2012	11	3			6.5	FB+FG
^<AS2013	17/01/2013	2013						
^/GU1	17/01/2013	2013	1.8	1			4	FB+FG
*	20/05/2013		32				6	Toto
^<GU2	17/01/2013	2013					2	FB+FG
*	20/05/2013		13				4	Toto
^<GU3	20/05/2013	2013					3	Toto

De retour du terrain, il faudra aussi penser à stocker la collection de bourgeon de manière à stopper l'évolution de ce dernier.

## Stades phénologiques

### Pour les UC

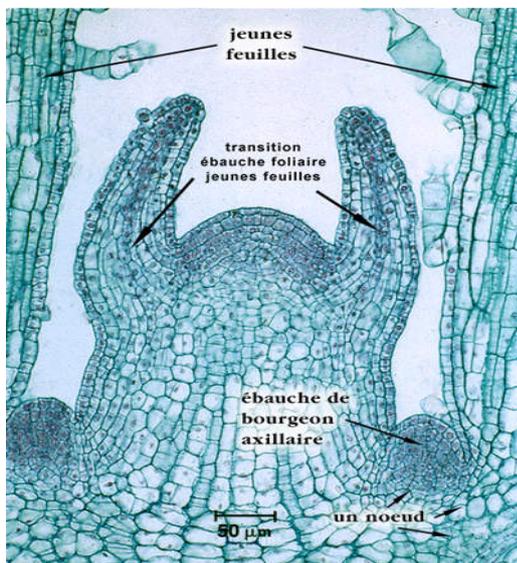
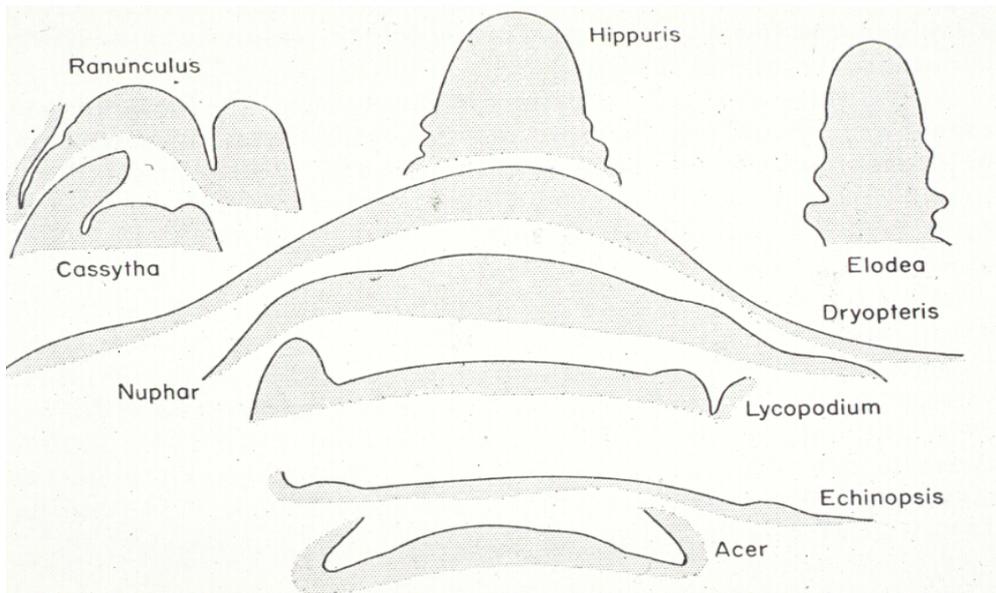
1. Dormance
2. Bourgeons gonflés : latéraux non visibles
3. Bourgeons éclatés : latéraux visibles collés à terminal
4. Elongation : début de croissance, sans aiguilles. La longueur est mesurée à partir de ce stade
5. Apparition des aiguilles : collées entre elles, forment un fourreau autour du bourgeon
6. Aiguilles non mures : peuvent encore être collées, s'écartent un peu de la tige, couleur claire
7. Aiguilles mures : écartée de la tige et individualisées, couleur mure

### Pour les cônes

1. Apparition du bouton floral
2. Croissance du bouton floral
3. Formation du cônelet
4. Maturation du cônelet : on mesure sa longueur à chaque passage

## Annexe 2 : Diversité de tailles et de formes de méristèmes dans le monde végétal

50  $\mu\text{m}$



*Acer sp.*



*Elodea sp.*

## Annexe 3 : Récapitulatif méthodologique

Cette annexe méthodologique relate les étapes des manipulations expérimentales sur les bourgeons qui permettent de les analyser. Les manipulations décrites correspondent à celles qui ont le mieux fonctionné et il faudra probablement encore les améliorer. Les bourgeons analysés dans l'étude n'ont pas tous subi ce traitement, ce pourquoi plusieurs d'entre eux présentent un méristème incomplet ou des déchirures dans la résine.

### **Sommaire :**

1. Dissection des bourgeons et préparation à la conservation.....	73
2. Etapes menant à l'imprégnation de résine de l'échantillon.....	74
3. Découpe au microtome du bloc de résine contenant l'échantillon.....	75
4. Montages-photo des lames d'intérêt pour les mesures.....	77
5. Mesures sous image J.....	78
6. Notes sur l'identification des axillaires :.....	78

### **1. Dissection des bourgeons et préparation à la conservation**

Avant la fixation, les bourgeons sont d'abord écaillés le plus possible. Les écailles sont à enlever très délicatement en tirant avec une pince (le découpage au ciseau est peu efficace et seulement écarter les écailles – au-dessus du méristème en particulier, zone où elles sont très nombreuses et imbriquées – risque d'abîmer ce dernier). Plus il y aura d'écailles retirées, meilleure sera la coupe finale du bourgeon. Dans un deuxième temps, sauf si le bourgeon est de petite taille ou s'il est peu écaillé, le bourgeon est coupé sur une voire deux faces, l'important étant de conserver la zone centrale du bourgeon, contenant le méristème et le plus grand diamètre de moelle.

*N.B. : La coupe d'une ou plusieurs face(s) du bourgeon a été faite après la fixation dans l'étude, il faudrait s'assurer que de le faire avant n'abîmera pas l'échantillon.*

Ensuite les bourgeons sont mis dans le fixateur. Le protocole de fixation se trouve en annexe 4. Une fois dans le fixateur, il est important de réaliser plusieurs dégazages à intervalles réguliers (échantillons placés dans une cloche à dégazer avec pompe à vide, cf. figure 1). Ce processus extrait une partie de l'air qui se trouve sous les écailles de protection et dans l'aérenchyme de la moelle, ce qui permet une meilleure pénétration du fixateur dans le matériel végétal. 48h de vide alterné (15 min de vide puis 15 min d'arrêt) dans le fixateur sont conseillées.

*N.B. : Il est très important pour la suite des analyses de prendre en photo la pousse annuelle prélevée avec le bourgeon puis une photo du bourgeon coupé, avant et après l'avoir écaillé. L'ensemble des photos doit se faire avec une échelle et chaque photo doit être clairement identifiée pour pouvoir être reliée à l'échantillon.*

Après la fixation, les bourgeons sont déshydratés (annexe 4 - déshydratation) par plusieurs bains d'alcool éthylique à 50 puis 70 % et sont conservés dans ce dernier bain à 4°C (pour une durée indéterminée). Chaque bourgeon est identifié individuellement afin de pouvoir le rattacher aux observations et mesures faites sur les unités de croissance (UC) sous-jacentes.



Figure 8 : Pompe à vide et cloche à dégazer

## 2. Etapes menant à l'imprégnation de résine de l'échantillon.

Le protocole présenté ci-dessous est le meilleur qui ait été trouvé après avoir testé plusieurs temps de manipulation et plusieurs produits facilitant la pénétration de la résine.

*Bains facilitant la pénétration de la résine et imprégnation :*

A chaque bain, le processus est accéléré par un passage au micro-ondes (cf. figure 2). La durée du passage pour chaque bain varie selon le matériel végétal et n'est pas toujours ici précisée car le protocole utilisé n'est pas officiellement établi par la plateforme d'histologie PHIV\* dans laquelle les manipulations ont été faites. Les étapes successives sont :

- Déshydratations supplémentaires dans des concentrations croissantes d'éthanol (70 puis 100 %), nécessaires car la résine est hydrophobe.
- Solution d'éthanol-butanol.
- Solution de glycérol-butanol pendant 26 min au micro-ondes ; le glycérol ramollit légèrement les tissus (durcis par la déshydratation) et permet une découpe plus facile du bourgeon.
- Solution de butanol pur ; le butanol solubilise les cires afin que la résine pénètre mieux au niveau des cuticules des écailles (annexe 4 – Imprégnation).
- Solution de butanol-résine, temps de passage au micro-ondes doublé.
- Dégazage dans une solution de résine pure, « l'imprégnation », 30 min avant passage au micro-ondes.
- Passage au micro-ondes dans la solution de résine pure.
- Une nuit de vide alterné (15 min) dans la résine pure.

Remarque : Le passage dans le glycérol-butanol n'enlève pas le problème de rigidité des écailles sur certains mois (en avril par exemple) entraînant un déchirement de la résine sur les coupes. En revanche, les bourgeons sont plus faciles à couper au microtome. Il est donc intéressant de garder cette étape dans le protocole. Fabienne Montes, technicienne sur la plateforme d'histologie PHIV, conseille d'augmenter la durée de mise sous vide dans le fixateur après la récolte (alternance du vide tous les quart d'heure pendant 48h d'affilée par exemple). Cela permettrait d'enlever plus d'air entre les écailles et le méristème apical ainsi

que entre les écailles des brachyblastes bien développés. Il est important de commencer à faire le vide dans les premières étapes car les bains suivants seront alors plus efficaces (notamment pour le butanol qui pénétrera mieux dans les tissus). En général, plus on fait le vide à différentes étapes, mieux ça marchera (selon Fabienne Montes).



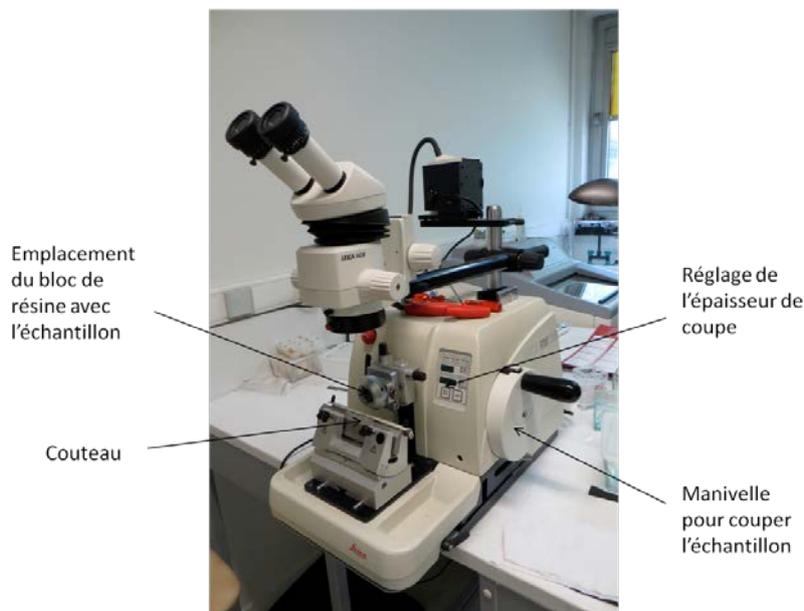
Figure 9 : Micro-ondes (accélère les étapes décrites précédemment)

*Inclusion de l'échantillon (cf. annexe 4 - inclusion) :*

L'échantillon est ensuite déposé dans un moule et recouvert de la solution de résine ajoutée d'un catalyseur. La polymérisation de la résine s'effectue dans le moule, en conditions d'anoxie. Les moules sont laissés à l'air libre le temps que la résine durcisse, et placés à l'étuve (37°C) pour conservation.

### **3. Découpe au microtome du bloc de résine contenant l'échantillon.**

Après avoir testé différentes épaisseurs de coupes, au vu des données à récolter sur les échantillons, il a été décidé de faire des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cela permet d'observer nettement les différents tissus du bourgeon. Au-dessous de cette 5  $\mu\text{m}$ , la résine a tendance à se déchirer. Le microtome est présenté en figure 3. *N.B. : S'il est décidé par la suite de faire des coupes de 1  $\mu\text{m}$  pour reconstituer le méristème en 3D, il sera probablement nécessaire de mettre au point un protocole d'imprégnation de la résine adapté à cette épaisseur de coupe.*



Lors de la découpe du bloc de résine au microtome, les points suivants ont été considérés :

- L'orientation du bloc est à ajuster au fur et à mesure des premières coupes : le bourgeon doit être aligné avec la lame sur la plus grande longueur possible, afin d'avoir des coupes qui passent au mieux par le centre du bourgeon sur toute sa longueur.
- Il est important que le couteau soit de bonne qualité, les lames font souvent des rayures sur les coupes.

Les coupes choisies pour être mises sur lame sont les suivantes :

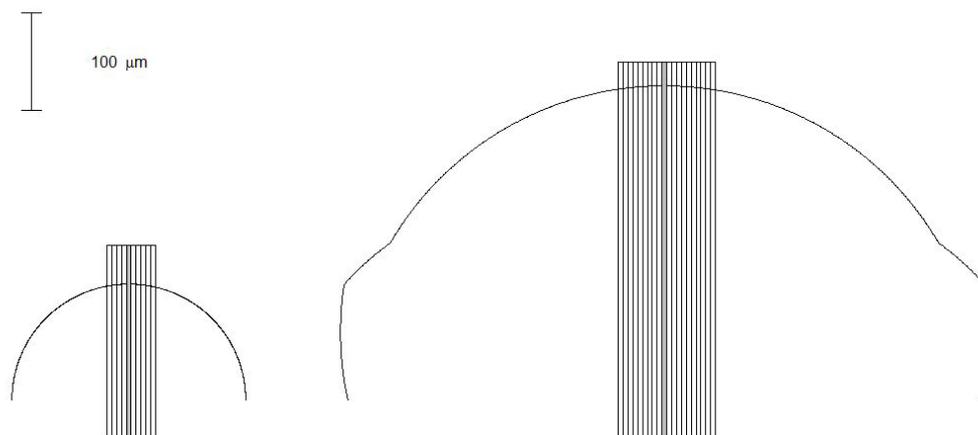
- Premières coupes présentant les vaisseaux des axillaires en coupe transversale, au cas où elles aideraient à différencier les types d'axillaires par de futures colorations.
- Coupes intermédiaires toutes les 10 coupes de 5  $\mu\text{m}$  par exemple. Celles-ci permettent d'observer les axillaires à différentes profondeurs de coupe.
- Coupes semblant se rapprocher du centre du dôme méristématique (présentant les différentes zones méristématiques illustrées dans le rapport et pour lesquelles les contours du dôme ne sont pas fuyants), ou du centre de la moelle (plus grande largeur possible et cellules alignées) – l'un arrivera avant l'autre selon que le bourgeon soit penché vers l'avant ou l'arrière dans le bloc de résine – ces coupes sont systématiquement gardées, dans leur ordre de succession.
- Quelques coupes au-delà du centre du dôme méristématique et du centre de la moelle, pour aider à l'identification des axillaires.

*N.B. : En général, mais pas systématiquement, l'espace entre les coupes est noté sur la lame. C'est information peut être importante à posteriori pour l'analyse.*

A l'avenir, pour bien sélectionner les coupes à garder, il est important d'avoir conscience des tailles extrêmes des axillaires et de celles du méristème. Voici celles observées sur l'ensemble des échantillons découpés pour cette étude :

- Un brachyblaste (sans la pointe des cataphylles qui l'entourent) fait au maximum 500  $\mu\text{m}$  de long et 375  $\mu\text{m}$  de large. Au minimum (état très précoce d'ébauche), il peut faire 125  $\mu\text{m}$  sur 125  $\mu\text{m}$ .

- Pour le méristème, le schéma ci-dessous (figure 4), illustre les tailles minimale et maximale observées sur les échantillons coupés, ainsi que la dizaine de coupes de 5 µm qui peut être gardée, passant à proximité du centre du dôme.



*N.B. : Plusieurs groupes de lames ont été laissés à l'issue de ce stage :*

- *Des lames sélectionnées pour leur intérêt dans l'identification des axillaires et les mesures que l'on a prises : elles sont préservées dans des « boîtes à lames » colorées.*
- *Le reste des lames gardées à la coupe mais n'ayant pas un intérêt particulier pour l'analyse est préservé dans des petites boîtes en carton.*

#### **4. Montages-photo des lames d'intérêt pour les mesures.**

*Coupes passant par le centre de la moelle :*

Trois coupes passant au mieux par le centre de la moelle sont gardées. Si possible, les lames sélectionnées doivent présenter un maximum d'axillaires visiblement vascularisés (car ils sont alors plus visibles en coupe longitudinale). Ces lames sont prises en photo avec un grossissement x5 (échelle finale de 1 pixel pour 1.4663 µm avec la caméra). Comme le bourgeon est trop grand pour être visualisé en entier on réalise une mosaïque de photo de différentes parties de la coupe, qui est ensuite reconstituée à l'aide d'une macro réalisée par Marc Lartaud sous le logiciel ImageJ.

*Coupes passant par le dôme méristématique :*

Toutes les lames passant près du méristème sont prises en photo au même grossissement que pour la moelle. Une autre macro sous ImageJ, réalisée par Marc Lartaud, permet, après s'être assuré du bon ordre des photos et de leur orientation (même droite et même gauche), de faire se succéder les photos en les ajustant au même niveau, afin de pouvoir repérer la coupe passant le mieux par le centre du méristème. Seule la coupe passant par le centre sera mesurée.

Remarque :

Les photos de méristème auraient pu être prises à un grossissement x10 voire x20, mais les mesures prises ne concernant que la forme du méristème, il n'était pas nécessaire d'augmenter le grossissement. Par ailleurs, maintenir le même grossissement que pour les coupes passant par le centre de la moelle, permet

d'estimer directement, sur les photos du méristème, la densité et la qualité des organes dans la zone apicale. Enfin, une fois le montage photo établi pour les faire défiler, le fait de voir évoluer également les axillaires proches du méristème apporte une grande aide à leur identification (ex. : savoir si ce sont des cataphylles ou non, si ce sont des ébauches de rameaux longs ou de cônes, etc).

*N.B. : Une coloration SCHIFF des lames a été faite avant de les prendre en photo, lorsque le méristème était déchiré et qu'il était trop difficile d'en observer l'organisation cellulaire.*

## **5. Mesures sous image J.**

Pour cette étape, une barre d'outil sous Image J a également été mise en place par Marc Lartaud, pour faciliter la prise des différentes mesures. Les types de mesures sont décrits dans le rapport, partie 1.3.2. Quelques points explicatifs sont cependant énumérés ci-dessous :

- Avant de prendre des mesures, il faut penser à calibrer l'échelle des photos (1 pixel pour 1.4663  $\mu\text{m}$ ).
- Les axillaires sont pointés à l'aisselle des feuilles axillantes.
- Seuls les axillaires dont plus de la moitié du volume est visible dans le plan de coupe sont comptés.
- Le pointage de chaque axillaire est projeté orthogonalement sur l'axe central, pour estimer la distance entre l'axillaire et la pointe du dôme méristématique (attention : comme le centre du méristème est rarement sur les mêmes coupes que celles sur lesquelles on a la plus grande largeur de moelle, cette distance des axillaires à l'apex doit être considérée avec un léger biais, dû à la projection).
- La plus grande largeur du dôme est prise sous le(s) dernier(s) primordia générés (attention à ne pas les confondre avec un méristème axillaire de feuille, faire défiler les photos aide également à éviter cette erreur). La largeur est souvent diagonale car la phyllotaxie est alterne spiralée.
- Si le méristème est déchiré, la largeur est prise au-dessus des éventuels primordia qu'on observe mal (dans le doute).
- La hauteur de dôme correspond à la projection orthogonale de la pointe du dôme sur la largeur mesurée.
- La surface des primordia est mesurée à titre indicatif (attention, cette surface varie avec le plan de coupe). Le plus petit primordium sous lequel la plus grande largeur de dôme a été prise est de 424  $\mu\text{m}^2$  (échantillon 03-13 6) et le plus grand fait 8450  $\mu\text{m}^2$  (échantillon 9-13 2).
- Concernant les mesures prises de densité des axillaires proches du méristème (sur les coupes présentant le centre du dôme méristématique), la longueur totale est fixée à 1360  $\mu\text{m}$ , afin de pouvoir comparer plus directement les mesures d'un bourgeon à l'autre.

*N.B. : Dans les documents laissés à l'issue du stage, les photos mesurées sont précédées de la mention « xxx » et les mesures sont toutes dans un Roi Manager spécifique à chaque photo. Il suffit d'ouvrir les deux documents simultanément sous image J.*

## **6. Notes sur l'identification des axillaires :**

- De manière générale pour identifier les axillaires, il a été nécessaire d'observer au microscope, à différents grossissements, plusieurs coupes présentant différentes projections des ébauches d'organe. Parfois une coloration au Schiff a également aidé à l'identification.
- Un brachyblaste bien développé (nettement visible à l'œil nu) a été inclus, puis coupé au microtome. L'objectif de cette manipulation était de voir la forme d'un méristème de brachyblaste à un stade

plus avancé que celui que l'on peut observer dans un bourgeon et de compter le nombre d'écaïlles maximal que l'on peut trouver à sa base. Cependant, ces observations n'ont pas aidé à différencier les brachyblastes des rameaux courts ou longs à un stade précoce. Les rameaux ont de toute façon moins d'écaïlles que les brachyblastes aux jeunes stades d'ébauche.

- L'idée est également venue que sous les ébauches de rameaux, il pourrait y avoir quelques cataphylles (en lien avec le schéma dans le document « the reproductive Biology of Lodgepole Pine » rassemblant des recherches de Owens). Mais cela ne semble être valide que pour le mois de décembre, possiblement pour protéger les rameaux en hiver.
- La place dans la série des types d'axillaires le long d'une UC, aide normalement à deviner si on est susceptible d'observer une ébauche de rameaux ou non. Mais parfois des axillaires ressemblant beaucoup à des rameaux (auxiblastes) sont observés au milieu d'une série d'ébauche de brachyblastes (voir la typologie, catégorie « indéterminé 2 »). Est-il possible que le Pin d'Alep préforme plus de rameaux courts/longs qu'il n'en développe réellement (avec avortement des brachyblastes qui seraient au-dessus du niveau observé de l'axillaire en question) ?

## **Annexe 4 : Protocoles de traitement des bourgeons**

- ➔ Protocole de fixation
- ➔ Protocole de déshydratation
- ➔ Protocole d'imprégnation
- ➔ Protocole d'inclusion
- ➔ Protocole de coloration au Schiff - Naphtol Blue Black



## Fixation Glutaraldéhyde Paraformaldéhyde Caffeine

Ref : MO-MET-HCL-011  
Version :2  
Date de création : 14/05/2008  
Page 1 sur 2

**OBJECTIF :**  
Cette étape permet de figer les cellules dans un état proche de celui où elles se trouvaient pendant la vie.

**MATERIEL :**

**REACTIFS :**

Tampon phosphate pH 7,2 0,2M

Solution A : NaH<sub>2</sub>P<sub>04</sub> anhydre (PM 120) 2,4 g  
H<sub>2</sub>O distillée 100 ml

Solution B : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre (PM 142) 2,84 g  
H<sub>2</sub>O distillée 100 ml

Solution tampon : solution A 28 ml  
Solution B 72 ml

Paraformaldéhyde à 20%, glutaraldéhyde à 50%

Utilisation de solutions prêtes à l'emploi.

FIXATEUR Glutaraldéhyde – Paraformaldéhyde – Caffeine

-tampon phosphate de Na 0,2 pH 7 50 ml  
-paraformaldéhyde à 20% 10 ml  
-glutaraldéhyde à 50% 2 ml  
-H<sub>2</sub>O distillée 38 ml  
-cafeine 1 g

**SECURITE :**

**Glutaraldéhyde**

Toxicité: [T- N](#)

Phrases de risques: [23/ 25- 34 -42/ 43 -50](#)

**Paraformaldéhyde**

Toxicité: [Xn](#)

Phrases de risques: [20/22 - 37/38- 40 – 41- 43](#) **CMR**

**Caffeine**

Toxicité: [Xn](#)

Phrase de risque : [22](#)

**Tween**

Toxicité: [ND](#)

**PROTOCOLE :**

- 1- Placer les échantillons dans le fixateur
- 2- Ajouter 1 à 2 gouttes de Tween 80
- 3- Faire le vide pendant 1H minimum, plusieurs heures pour gros échantillons

(Il est nécessaire de casser le vide plusieurs fois pour favoriser la pénétration du fixateur au sein des tissus aérochymes. Alternance 15 mn vide / 15 mn air. Les échantillons sont au fond du pilulier à la fin des dégazages.)

- 4- Placer à 4° pendant 48h

Rédacteur	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
Fabienne Montès	Jean-Luc Verdeil	Christine Sanier

<p>5- Mettre dans éthanol 50% pendant 1h  6- Mettre dans éthanol 70% et conserver toute une nuit à 4°  A cette concentration, les échantillons peuvent être stockés pendant plusieurs jours ou plusieurs mois.</p>
<p>INTERPRETATION :  On utilise ici un fixateur dit réticulant : les aldéhydes (formaldéhydes, et glutaraldéhydes) diffusent à l'intérieur des tissus et agissent en formant des pontages covalents entre deux parties d'une même protéine ou de deux protéines différentes. Les lipides sont également fixés et les tissus durcis (ce qui en facilite la coupe).</p>
<p>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :</p>
<p>EXEMPLE D'IMAGES :</p>

Rédacteur	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
Fabienne Montès	Jean-Luc Verdeil	Christine Sanier



## Déshydratation

Ref : MO-MET-HCL-012  
Version :1  
Date de création : 14/05/2008  
Page 1 sur 1

OBJECTIF : Déshydrater les échantillons par le jeu de bains d'alcool éthylique de concentration croissante et de bain de butanol si nécessaire
MATERIEL :
REACTIFS : <u>Ethanol</u> <u>Butanol</u>
SECURITE : <u>Ethanol</u> Toxicité: <u>F</u> Phrases de risques: <u>11</u> <u>Butanol</u> Toxicité: <u>Xn</u> Phrases de risques: <u>10 22 37/38 41 67</u>
PROTOCOLE :  - éthanol 70%            45mn - ethanol 90%            1h - ethanol 95%            1h - ethanol 100%           1h  <b>Puis selon la nature des échantillons</b> <b>Soit si butanol utile</b> -éthanol – butanol 50/50    24h a 4° -butanol 100% faire le vide 30mn -laisser 4 à 5 jours dans cette solution au froid à 4° en agitation <b>Soit si butanol inutile</b> directement dans nouveau bain d'éthanol 100% une nuit à 4°
INTERPRETATION : Le butanol améliore la pénétration de la résine au niveau des cuticules en solubilisant les cires. Il facilite ainsi la transition entre les étapes de déshydratation et d'imprégnation.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :
EXEMPLE D'IMAGES :

Rédacteur Fabienne Montes	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
------------------------------	--------------------------	------------------



## Imprégnation

Ref : MO-MET-HCL-013  
Version :1  
Date de création : 14/05/2008  
Page 1 sur 2

**OBJECTIF :** Faire pénétrer la résine liquide à l'intérieur des tissus et des cellules.  
La composition et la durée de la phase d'imprégnation est différente suivant la nature des tissus (mous ou durs)

### MATERIEL :

### REACTIFS :

#### Résine tissus mous

Kit Résine Technovit 7100	500ml
Initiateur (5 sachets en poudre dans le kit)	5gr
Ethylène glycol diméthacrylate	2 ml
PEG 400 (softener)	10ml

#### Résine tissus durs

Kit Résine Technovit 7100	500 ml
Initiateur (poudre)	5 g
Méthyl méthacrylate	5 ml
Ethylène glycol diméthacrylate	2 ml

Mettre en agitation douce jusqu'à dissolution de l'initiateur. Ce milieu peut se conserver au moins 4 semaines à 4° à l'obscurité.

### SECURITE :

#### Butanol

Toxicité: [Xn](#)

Phrases de risques : [10-22-37/38-41-67](#)

#### Ethylène glycol diméthacrylate

Toxicité: [Xi](#)

Phrases de risques : [36/37](#)

PEG 400 : [irritant, sensibilisant](#)

#### Méthyl méthacrylate

Toxicité: [Xi F](#)

Phrases de risques : [11-37/38-43](#)

### PROTOCOLE :

#### Si échantillons déshydratés à l'éthanol 100%

Préparer une solution (50/50V) éthanol 100% / résine tissus durs ou résine tissus mous selon la nature des échantillons

#### Si échantillons déshydratés au butanol 100%

Préparer une solution (50/50V) butanol 100% / résine tissus durs ou résine tissus mous selon la nature des échantillons

Placer les échantillons dans le mélange et dégazer sous vide 30mn

Puis placer 2 jours minimum au froid à 4°

Rédacteur Fabienne Montès	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
------------------------------	--------------------------	------------------



## Imprégnation

Ref : MO-MET-HCL-013  
Version :1  
Date de création : 14/05/2008  
Page 2 sur 2

Passer en résine tissus mous ou tissu dur 100% La durée d'imprégnation dépend du matériel végétal

### INTERPRETATION :

Le PEG 400 ajouté permet d'obtenir une résine plus tendre. Celle-ci possédant un pouvoir hydrophile l'ajout de ce composé peut poser problème si l'hygrométrie est élevée.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

### EXEMPLE D'IMAGES :

Rédacteur	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
Fabienne Montès		



## Inclusion en résine GMA (d'explants présentant des tissus durs)

Ref : MO-MET-HCL-006  
Version :1.2  
Date de création : 24/01/2007  
Page 1 sur 2

OBJECTIF : Comment inclure en résine des échantillons végétaux présentant des tissus durs
MATERIEL :
REACTIFS :
<u>Résine tissus dur</u> Kit Résine Technovit 7100                    500ml Initiateur (poudre)                            5g Méthyl méthacrylate                           5ml Ethylène glycol diméthacrylate            2ml Mettre en agitation douce jusqu'à dissolution de l'initiateur. Ce milieu peut se conserver au moins 4 semaines à 4°C et à l'obscurité.
<u>Milieu d'inclusion tissus durs</u> Résine tissu dur                                15ml Accélérateur durcisseur                    1ml
SECURITE : Pour la préparation de la résine (GMA) et pour la réalisation des inclusions porter des gants et se placer sous sorbone
Kit Résine technovit 7100 Toxicité : <b>Xi</b> Phrases de risques : <a href="#">36/38-43</a>
Méthyl méthacrylate Toxicité <b>F Xi</b> Phrases de risques <a href="#">11-37/38-43</a>
Ethylène glycol diméthacrylate Toxicité : <b>Xi</b> Phrases de risques : <a href="#">36/37</a>
PROTOCOLE :
Après fixation et déshydratation Imprégnation en résine tissus durs
<u>Inclusion</u> Cette inclusion se fait avec le même type de résine que celle employée pour l'imprégnation.
Préparer le milieu d'inclusion, agiter pendant 1 min sans faire de bulles. Le milieu est visqueux au bout de 15 à 30 min et polymérise à partir de 5 min (suivant la température ambiante). Verser le milieu d'inclusion de façon à ce que le niveau se situe un peu au-dessus de la dépression inférieure du moule. Eponger légèrement sur du papier l'explant au sortir du milieu d'imprégnation. L'immerger et l'orienter dans le moule tant que le milieu est liquide. Il est conseillé de surveiller sous loupe binoculaire la bonne orientation de l'objet. La réaction étant exothermique, il y a existence de mouvements de convection et possibilité de déplacement de l'explant au cours du durcissement. Attendre à température ambiante, que la résine prenne autour puis mettre les inclusions à 37° C jusqu'à ce que la résine ait complètement durcie.

Rédacteur Véronique Ripetti	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
--------------------------------	--------------------------	------------------



## **Inclusion en résine GMA (d'explants présentant des tissus durs)**

Ref : MO-MET-HCL-006  
Version :1.2  
Date de création : 24/01/2007  
Page 2 sur 2

Remarque : Il faut tenir compte du volume de résine nécessaire en fonction du volume des moules choisis. La polymérisation étant exothermique, il y a risque de "cuisson" des explants (risque plus important dans les grands moules).

INTERPRETATION :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Rédacteur	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
Véronique Ripetti		





## Acide Périodique–Schiff (+) Naphthol Blue Black (CI 20 470)

Ref : MO-MET-HCL-001  
Version :3  
Date de création : 03/06/2009  
Page 2 sur 2

### PROTOCOLE :

- a – Hydrolyser à l'acide périodique fraîchement préparé, à TA 5 mn
  - b – Laver à l'eau courante puis à l'eau distillée. Bien égoutter les lames avant de poursuivre.
  - c – Colorer par le réactif de Schiff à l'obscurité à TA 10 mn. Contrôle microscopique après rinçage à l'eau.
  - d – Laver dans un bain d'eau sulfureuse si régression coloration Schiff nécessaire.
  - e – Laver à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau soit incolore puis à l'eau distillée (Il est important de changer rapidement les bains)
  - f – Filtrer la solution de Naphthol Blue Black puis colorer dans le NBB porté préalablement à 50°C 5 min
  - g – Laver rapidement à l'eau courante
  - h – Régresser rapidement par l'acide acétique à 7% dans l'eau distillée sous contrôle microscopique  
(Les parois doivent reprendre leur coloration rouge due au Schiff).
  - i – Sécher et monter.
- NB : si matériel végétal riche en protéines (méristèmes, embryons) colorer à froid dans NBB

### INTERPRETATION :

- Parois et composés APS positif, surtout les réserves sous forme d'amidon, en rouge/rose
  - Nucléoles, noyaux en bleu/vert
    - Réserves protéiques en bleu/noir
- [Prétraitement à effectuer après une fixation réalisée à l'aide de fixateurs aldéhydiques et en particulier ceux contenant de l'acroléine](#)

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

### EXEMPLE D'IMAGES :

Rédacteur	Approbateur Scientifique	Vérificateur AQR
Fabienne Montès	Jean-Luc Verdeil	Christine Sanier

### Annexe 5 : Distances euclidiennes – Extrait de matrice

row.names	PolycyclismeN	LongueurN	LgN1	LgN2	LgN3	LgN4	LgN5	Polycyclisme2012	Lg2012	Lg2012UC1
<b>05-13 5</b>	<b>-0.6681182</b>	<b>-1.15322086</b>	<b>-0.90836167</b>	<b>-0.7547174</b>	<b>-0.38220061</b>	<b>NaN</b>	<b>NaN</b>	<b>0.5724739</b>	<b>-0.62819997</b>	<b>-0.66589775</b>
P 1-N 1	-0.6681182	0.06109445	-0.90836167	0.5482943	-0.38220061	NaN	NaN	-0.6734987	-0.35331089	0.02088181
P 1-N 4	-0.6681182	-0.68617651	-0.25785751	-0.5542541	-0.38220061	NaN	NaN	-0.6734987	0.71570220	2.33876284
P 2-N 1	-0.6681182	0.90177428	-0.04102279	1.0494527	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	0.89896159	-0.15081308
P 2-N 3	0.8769051	2.76995168	0.60948138	1.7510744	5.71324008	NaN	NaN	-0.6734987	-0.75037290	-0.06496563
P 3-N 2	2.4219283	1.23804621	-0.25785751	1.4503794	-0.01647416	NaN	NaN	-0.6734987	0.28809697	1.48028838
P 3-N 4	-0.6681182	0.62154767	-0.47469223	0.9492210	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	0.77678867	-0.58005031
P 4-N 1	0.8769051	0.90177428	-1.12519639	1.4503794	0.22734346	NaN	NaN	-0.6734987	0.62407251	1.95244933
P 4-N 3	-0.6681182	-1.43344747	-1.12519639	-0.9551808	-0.38220061	NaN	NaN	-1.9194712	-1.14743490	1.00812743
P 5-N 5	-0.6681182	0.34132106	-2.42620471	1.5506111	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	-0.56711351	-0.70882148
P 6-N 3	0.8769051	1.53695459	-0.04102279	1.6508428	0.10543465	NaN	NaN	-0.6734987	0.50189958	1.48028838
P 6-N 4	-0.6681182	-0.31254103	-0.04102279	-0.2535590	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	-0.47548382	-0.75174520
P 7-N 3	-2.2131414	-2.46094504	-1.55886583	-1.8572658	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	0.28809697	-0.15081308
P 7-N 4	0.8769051	-0.18176861	0.17581194	-0.2535590	-0.13838298	NaN	NaN	0.5724739	0.71570220	-0.49420286
P 8-N 3	0.8769051	0.90177428	-0.04102279	0.9492210	0.22734346	NaN	NaN	0.5724739	-0.01733535	-0.83759264
P 8-N 4	0.8769051	-0.79826715	0.82631610	-1.2558758	0.10543465	NaN	NaN	0.5724739	0.19646727	0.92227999
<b>P 9-N 1</b>	<b>-0.6681182</b>	<b>0.24791219</b>	<b>0.17581194</b>	<b>0.2475993</b>	<b>-0.38220061</b>	<b>NaN</b>	<b>NaN</b>	<b>0.5724739</b>	<b>-0.47548382</b>	<b>-0.53712658</b>
P 10-N 1	0.8769051	1.55563637	1.69365498	0.8489894	0.22734346	NaN	NaN	0.5724739	1.93743145	-0.32250797
P 10-N 2	-2.2131414	-0.40594990	3.21149803	-1.8572658	-0.38220061	NaN	NaN	0.5724739	0.62407251	-0.23666053

La première ligne correspond au bourgeon que l'on souhaite relier à un individu qui est suivi sur l'allongement de sa pousse annuelle : le bourgeon de mai (05) 2013, individu 5, dans cet exemple. Les lignes suivantes correspondent aux 40 individus dont on suit l'allongement de la PA (seuls les 18 premiers sont ici affichés). En colonne, le taux de polycyclisme de la pousse annuelle en cours d'allongement et la taille de chacune des UC de cette pousse (pas de valeurs pour les UC 4 et 5 car non observées en mai). Puis les mêmes données pour la pousse de 2012 et celle de 2011 (la totalité des colonnes n'est pas affichée).

Dans l'exemple de cette annexe, le bourgeon n°5 prélevé en mai 2013 et rattaché à l'individu P9-N1 (l'individu n°1 de la parcelle n°9) par le calcul de la distance euclidienne sur l'ensemble des données comparées (colonnes). En effet, lorsqu'on calcul la distance euclidienne entre les données pour l'individu dont on a prélevé le bourgeon « 05-13 5 » et les données de chaque individu suivi en allongement, on obtient les résultats suivants (encore une fois présentés seulement pour les 18 premiers individus participant au suivi d'allongement) :

Individu	Distance
P 1-N 1	4.168481
P 1-N 4	5.466386
P 2-N 1	5.210710
P 2-N 3	12.433406
P 3-N 2	6.922899
P 3-N 4	4.059783
P 4-N 1	5.839933
P 4-N 3	4.901635
P 5-N 5	3.792363
P 6-N 3	6.610831
P 6-N 4	3.272816
P 7-N 3	3.502393
P 7-N 4	4.337369
P 8-N 3	5.213567
P 8-N 4	3.591375
<b>P 9-N 1</b>	<b>2.984118</b>
P 10-N 1	7.000615
P 10-N 2	5.697824

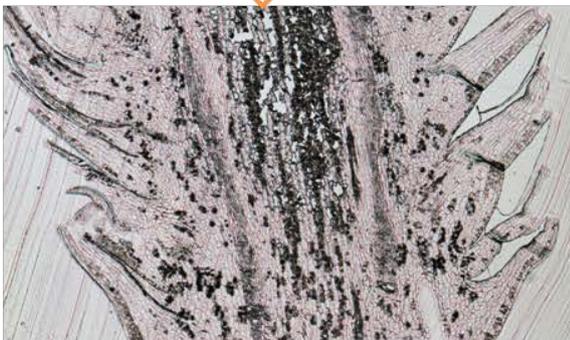
La plus petite distance (ici en gras) correspond à celle de la comparaison avec P9-N1 (les valeurs non affichées sont toutes plus petites que 2.98).

## Annexe 6 : Illustrations de la typologie des productions axillaires.

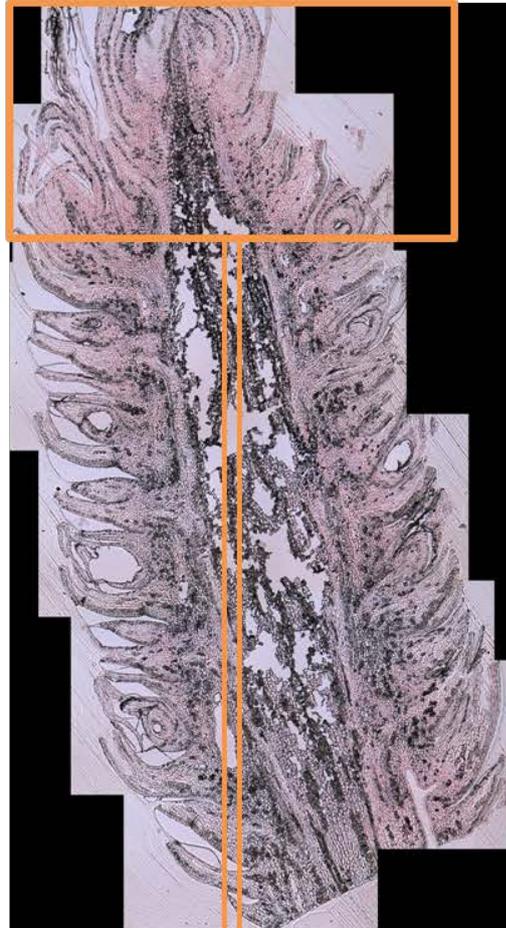
### Cataphylles (cb et ch) Feuille n'axillant pas d'organe



ZOOM



**Cataphylles basses :**  
base de l'unité de croissance en  
cours d'organogénèse



ZOOM



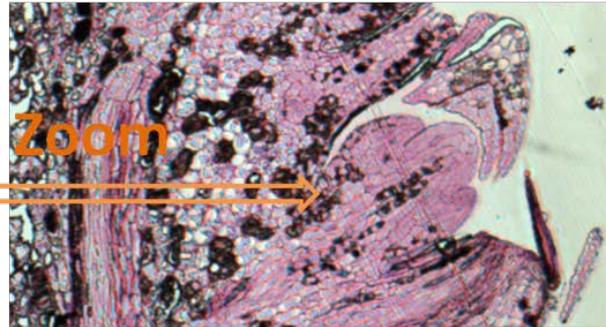
**Cataphylles hautes :**  
base de l'unité de croissance suivante

## Brachyblaste - Stade 1 (b1)



Ebauches latérales du brachyblaste  
pas ou peu distinctes

## Brachyblaste - Stade 2 (b2)

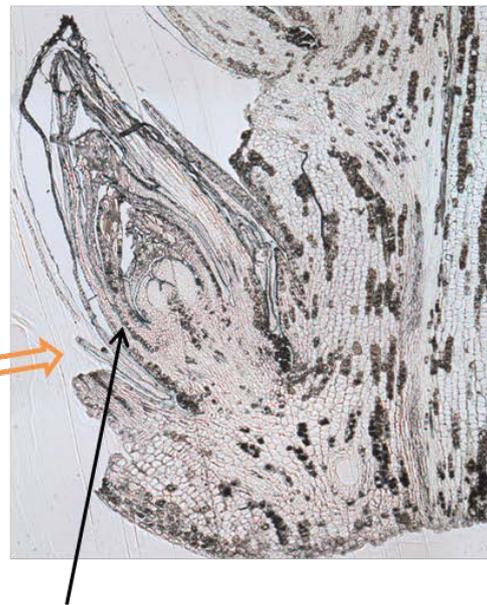


Ebauches latérales du brachyblaste bien distinctes, allongement net de l'organe.

### Brachyblaste - Stade 3 (b3)

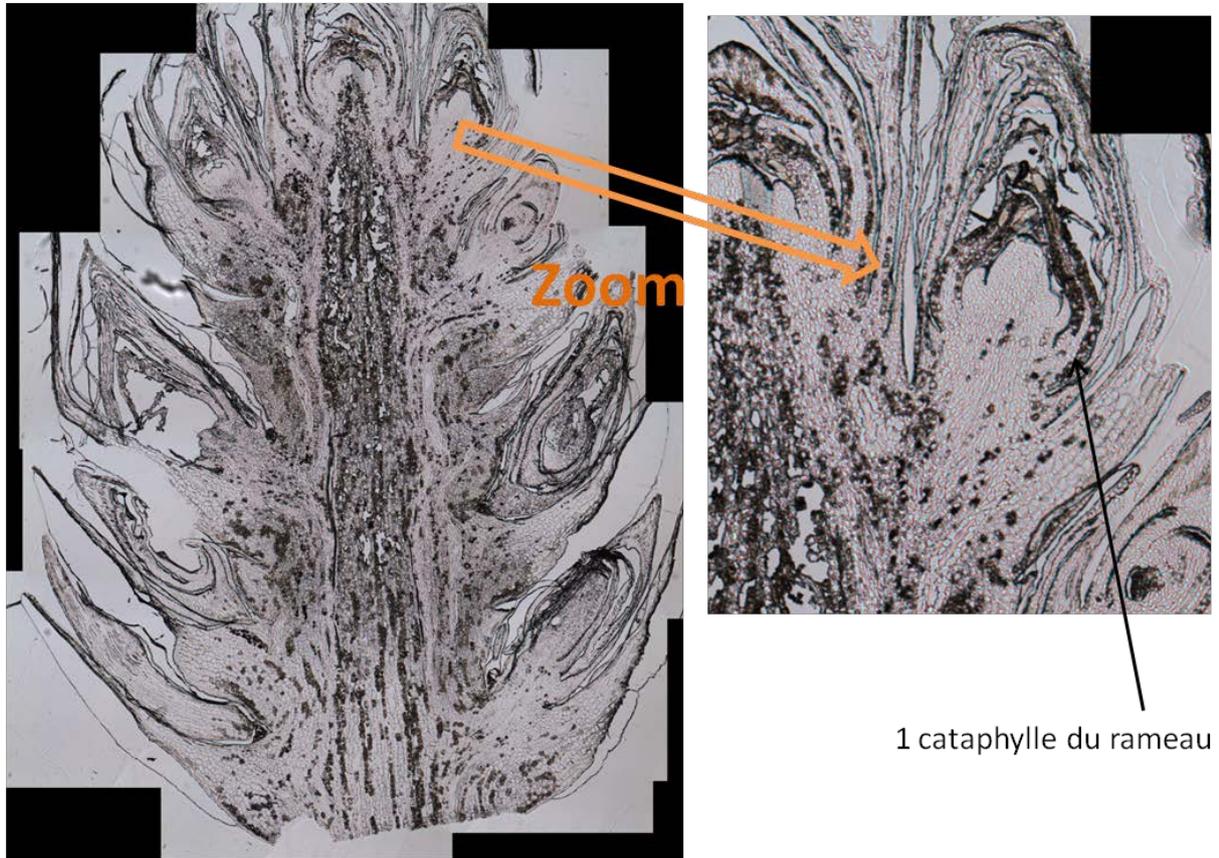


Ebauches latérales bien distinctes, allongement net de l'organe et **minimum 3 cataphylles développées sur le côté du brachyblaste.**



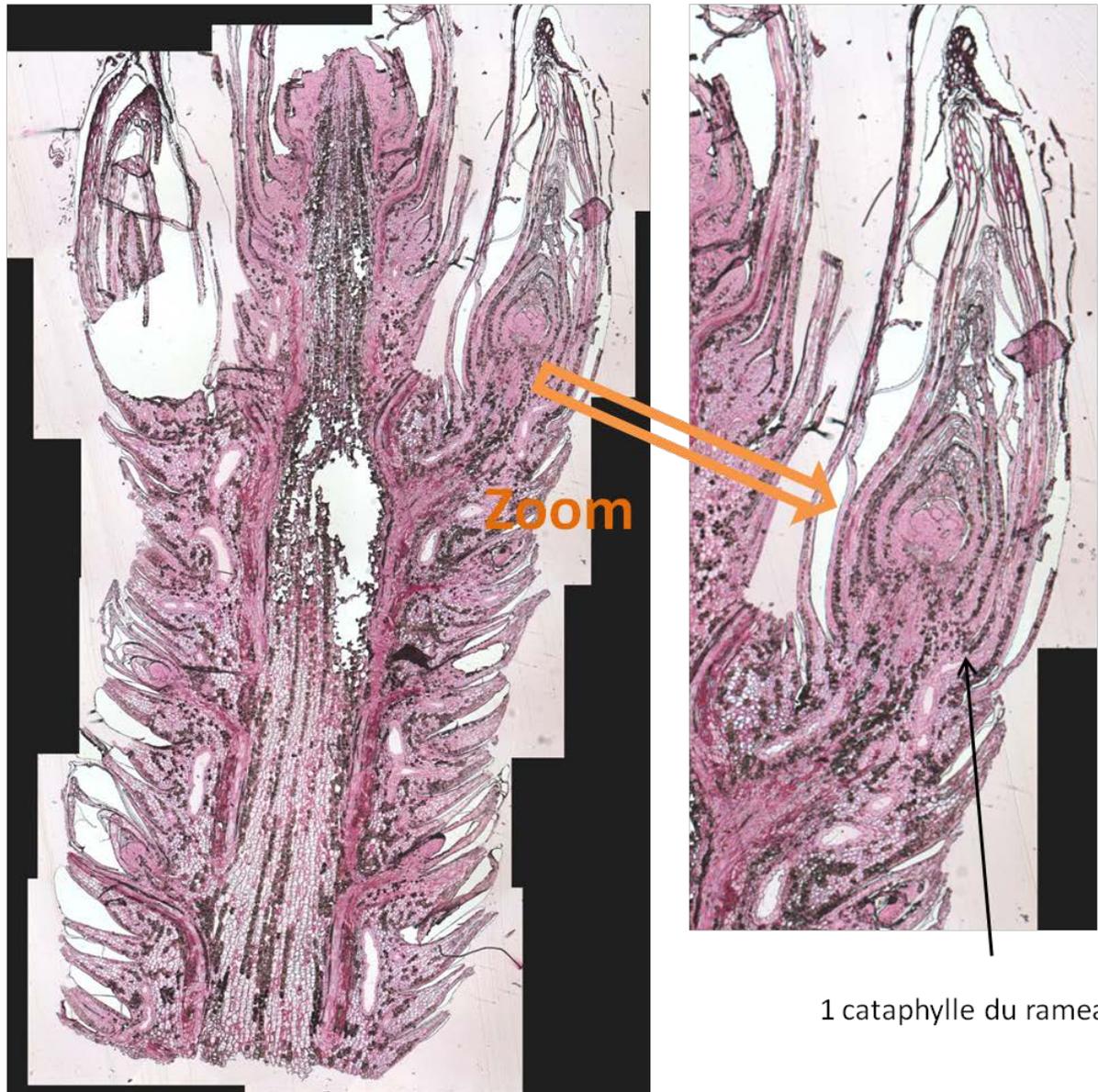
1 cataphylle du brachyblaste

## Auxiblaste (ou rameau long/court) - Stade 1 (r1)



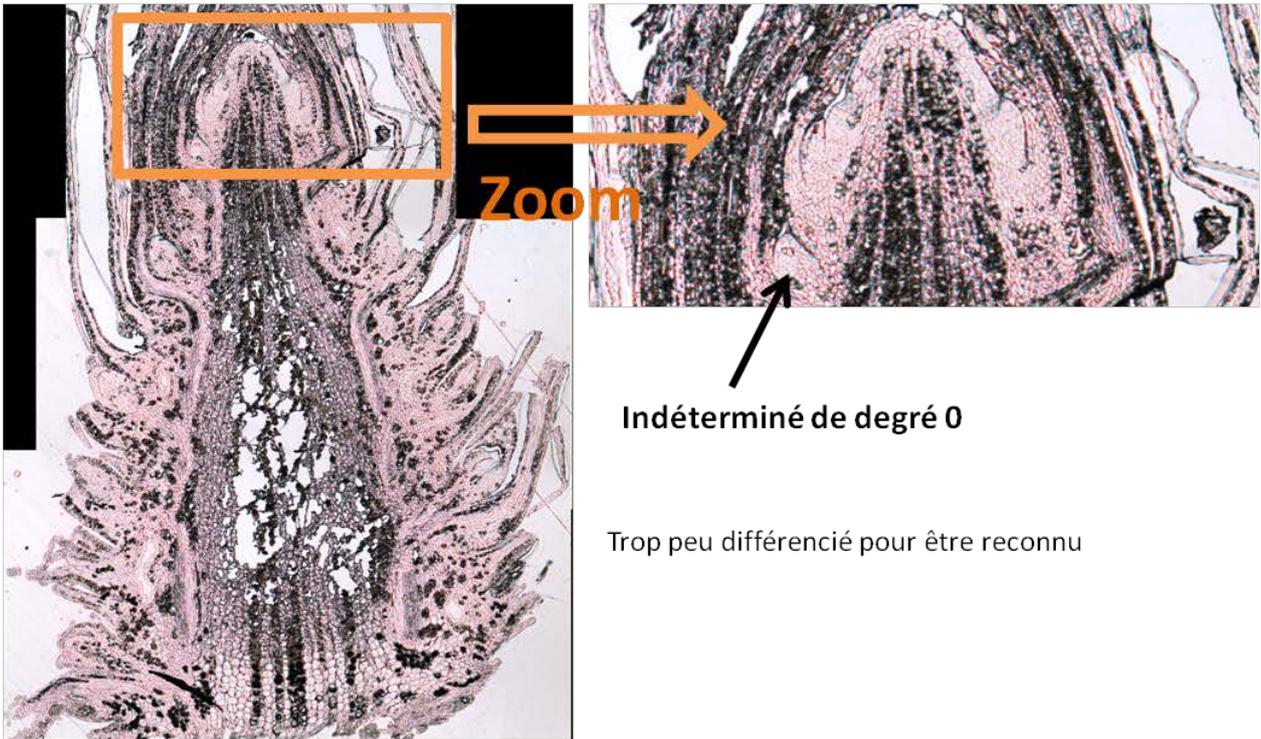
Organe localisé sous des cataphylles hautes, recourbé vers le haut.  
Moins de 5 cataphylles distinctes sur un côté de l'organe.

## Auxiblaste (ou rameau long/court) - Stade 2 (r2)

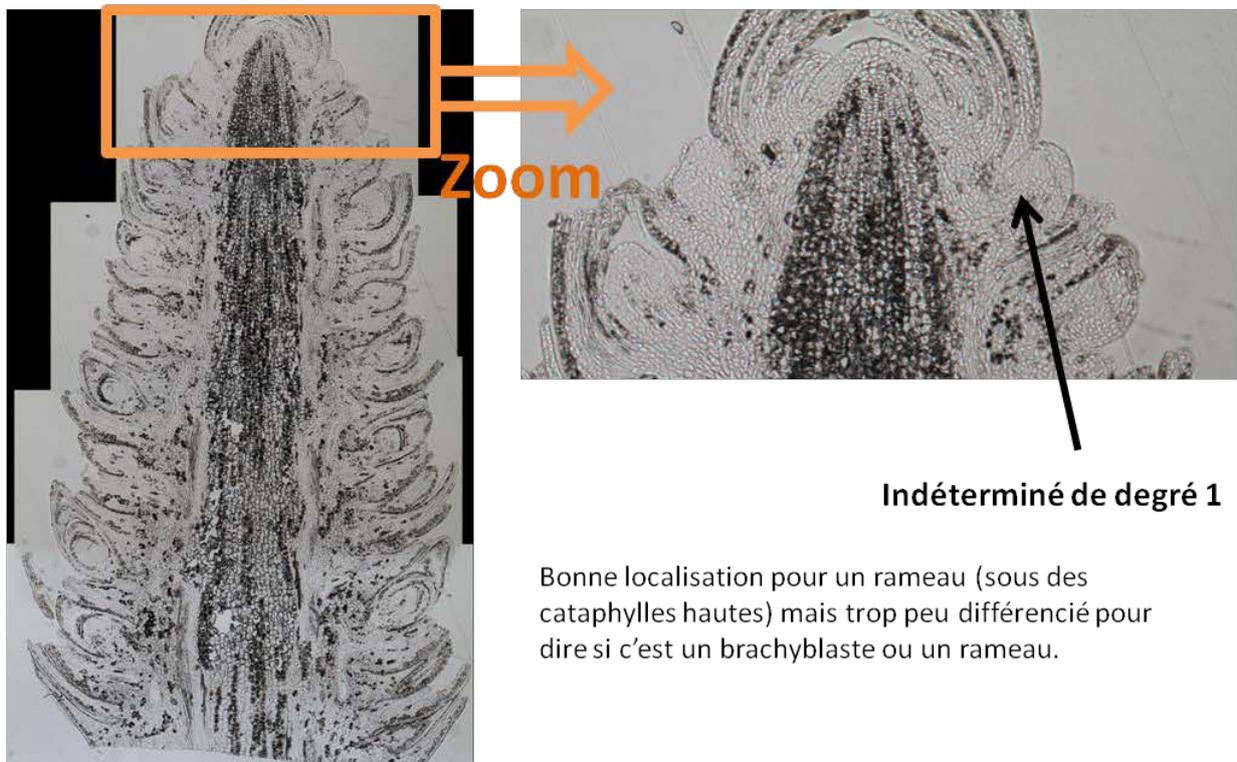


Organe localisé sous des cataphylles hautes, recourbé vers le haut.  
Minimum 6 cataphylles distinctes sur un côté de l'organe.

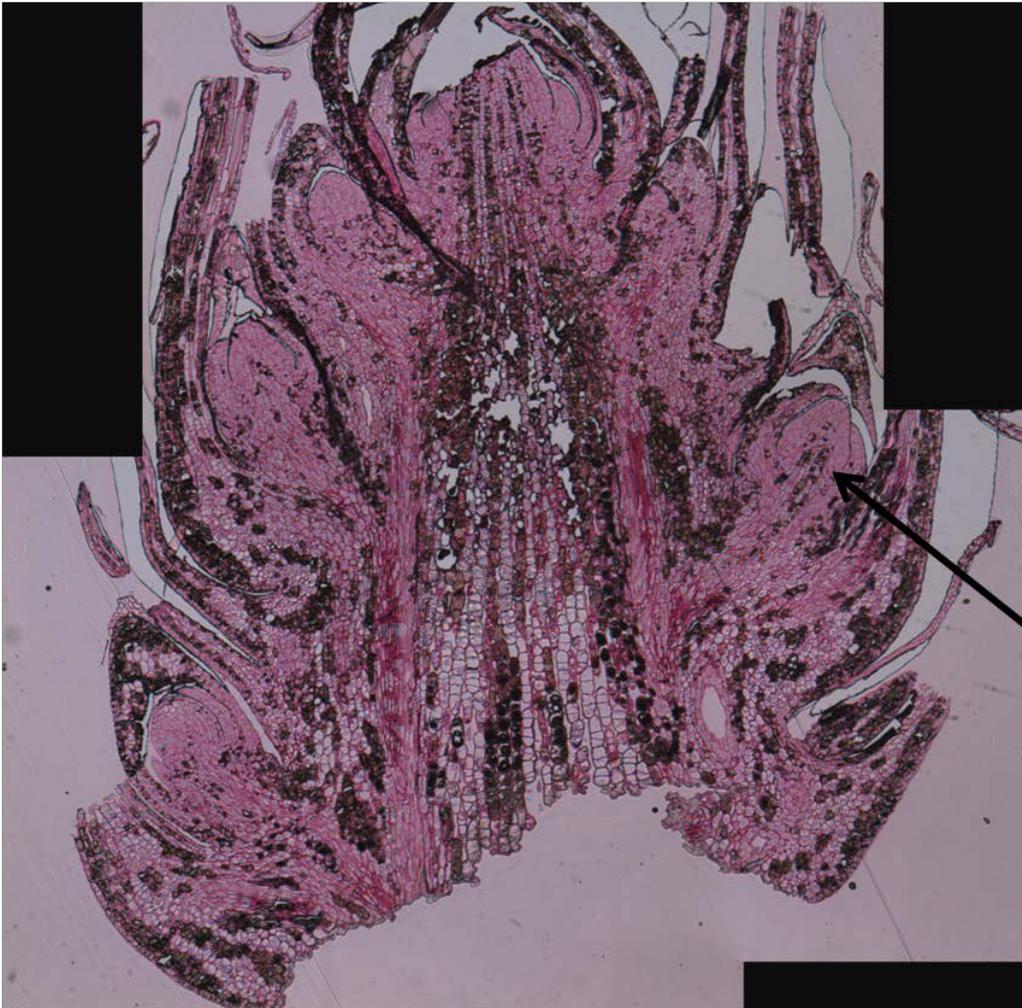
### Indéterminé - degré 0 (i0)



### Indéterminé - degré 1 (i1)



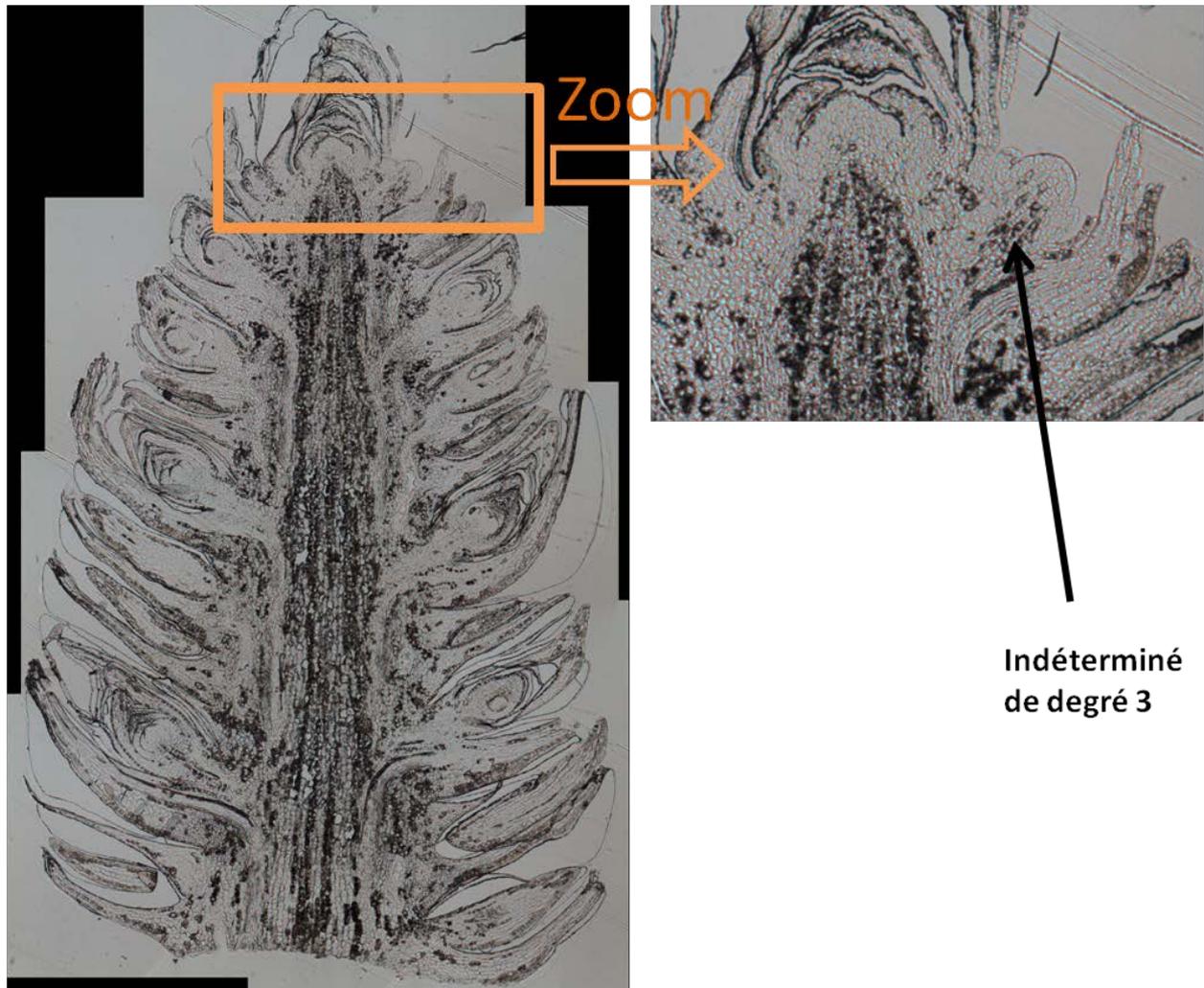
## Indéterminé - degré 2 (i2)



Indéterminé  
de degré 2

Ressemble beaucoup à une ébauche de rameau mais n'est pas au bon endroit dans la séquence d'axillaires : on devrait n'avoir que des cataphylles hautes au-dessus.

## Indéterminé - degré 3 (i3)



Bonne localisation pour un rameau (sous des cataphylles hautes), plutôt développé. On voit bien que l'organe est recourbé vers le haut (comme un rameau) et que le méristème est arrondi (et non pointu comme pour les brachyblastes).

Un doute persiste cependant pour affirmer que c'est une ébauche de rameau.

**Annexe 7 : Tableau d'entrée de l'ACP - Extrait des six premières lignes  
(avec tous les bourgeons analysés en ligne et les 44 variables analysées en colonne)**

	LgTot	DensTot	DensCb	DensB3	DensB2	DensB1	DensB111	DensB2112	DensB2R1	DensB2R2	DensB313R1
03-13 5	3298	5.45	2.42	0.00	5.56	9.24	0.00	0.00	0	0	0.00
03-13 6	5205	4.42	0.00	2.58	6.80	0.00	0.00	0.00	0	0	0.00
04-13 5	6452	2.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	1.47
04-13 6	6782	3.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	1.35
05-13 5	3492	4.79	2.18	0.00	5.00	9.20	0.00	0.00	0	0	0.00
05-13 6	6714	3.48	1.97	0.00	3.85	9.00	0.00	0.00	0	0	0.00

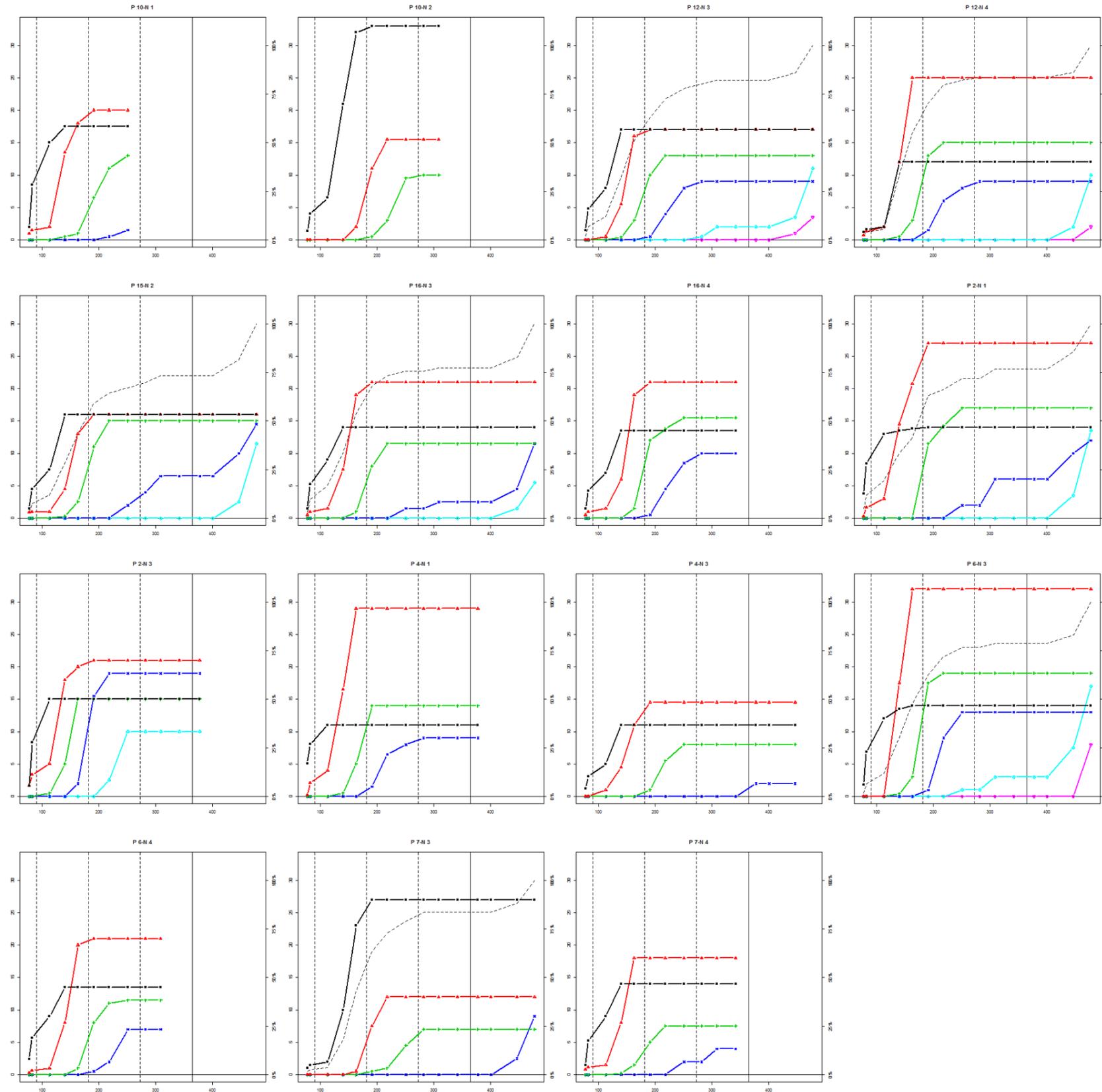
	NUC	DensSom	Axil	VolMax	Volmin	UCPrec	LgPrec	NRamPrec	NConePrec	NUCCorr	NUCPrecCor
03-13 5	2	7.35	2	26795004	12874799	1	1.5	4	0	2	1
03-13 6	2	7.36	0	20555214	7776628	1	3.0	4	0	2	1
04-13 5	2	5.88	1	39215267	22937594	1	10.5	2	1	2	1
04-13 6	2	7.35	1	66853034	66853034	1	7.5	2	1	2	1
05-13 5	3	5.88	2	68330702	24964488	2	5.5	3	0	3	2
05-13 6	3	5.88	3	19759470	12531017	2	3.0	2	0	3	2

r	Polycyclisme	LongueurN	LgN1	LgN2	LgN3	LgN4	LgN5	Polycyclisme	Lg2012	Lg2012UC1	Lg2012UC2
03-13 5	1	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	2	36.5	23.0	13.5
03-13 6	1	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3	62.0	16.0	23.5
04-13 5	1	10.5	10.5	0.0	0.0	0.0	0.0	4	71.0	16.0	28.0
04-13 6	1	7.5	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0	4	73.0	9.5	27.5
05-13 5	2	17.0	11.5	5.5	0.0	0.0	0.0	4	57.0	14.0	20.0
05-13 6	2	16.0	13.0	3.0	0.0	0.0	0.0	4	59.0	19.0	13.0

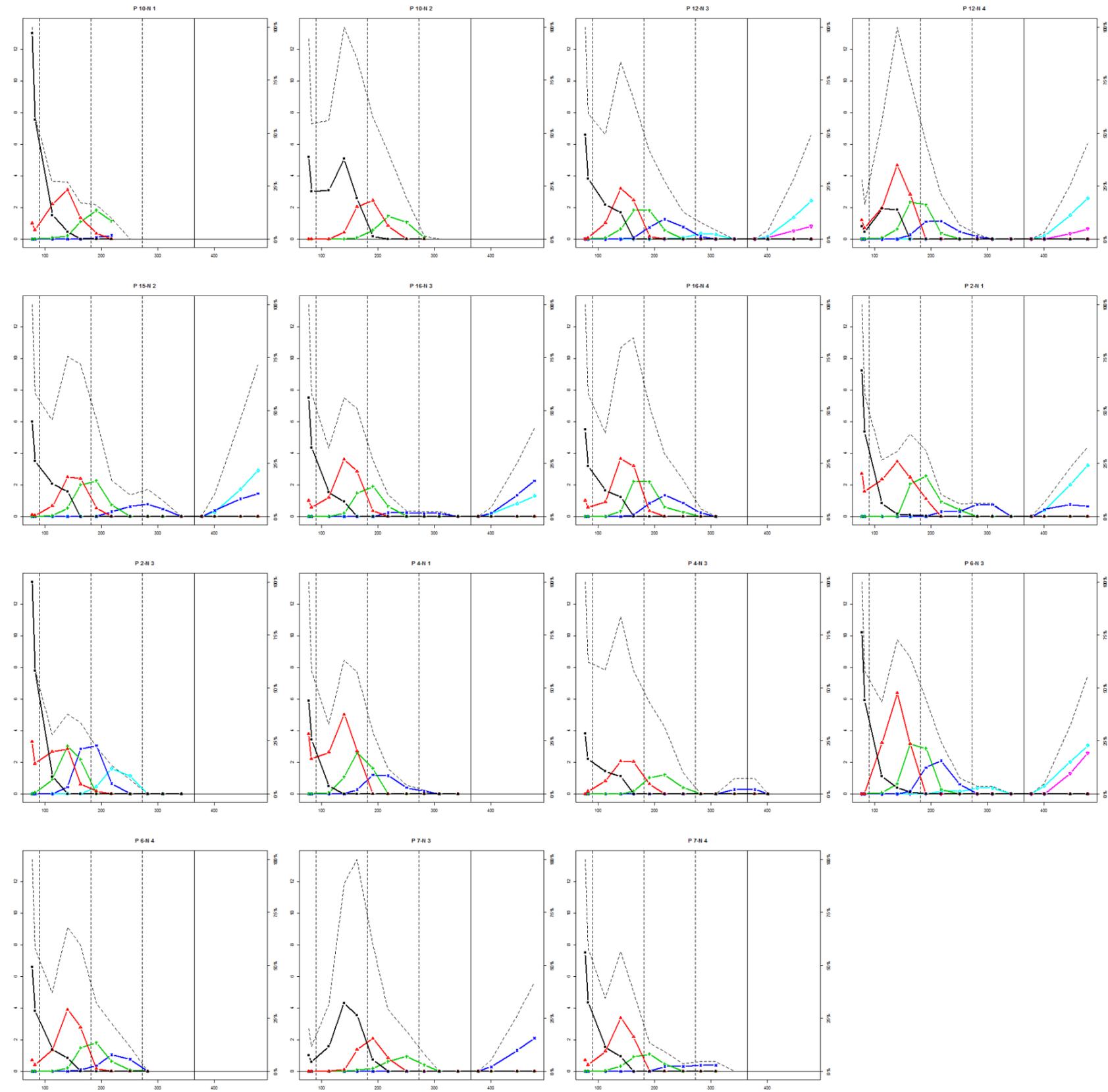
	Lg2012UC3	Lg2012UC4	Polycyclisme	Lg2011	Lg2011UC1	Lg2011UC2	Lg2011UC3	Lg2011UC4	date	Acc	Voisin
03-13 5	0.0	0.0	4	62.5	15.5	19.5	16.5	11.0	19/03/2013	3.8000000	P 4-N 3
03-13 6	22.5	0.0	4	73.5	13.5	26.0	17.5	16.5	19/03/2013	6.6000000	P 11-N 3
04-13 5	15.5	11.5	4	59.5	22.0	11.5	12.0	14.0	24/04/2013	3.7732975	P 3-N 4
04-13 6	22.0	14.0	4	69.0	16.0	20.0	16.5	16.5	24/04/2013	3.0585424	P 11-N 3
05-13 5	15.0	8.0	3	66.0	36.0	14.0	16.0	0.0	21/05/2013	3.6231884	P 9-N 1
05-13 6	16.0	11.0	4	73.0	25.0	18.0	15.0	15.0	21/05/2013	4.3993559	P 11-N 3

## Annexe 8 : Allongement et accroissement de la pousse annuelle - résultats pour tous les individus suivis.

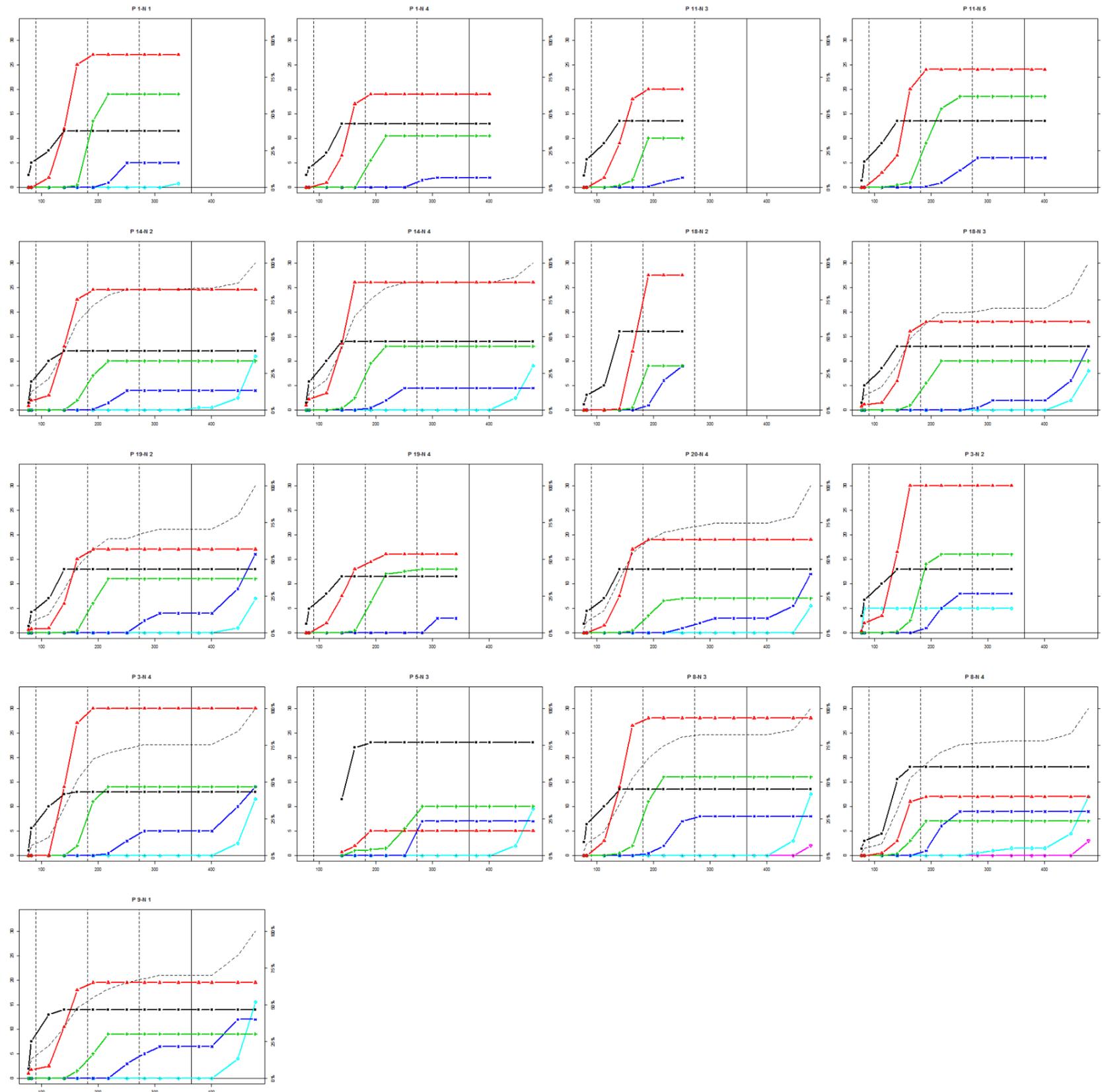
**Allongement** de la pousse du tronc des individus de **peuplement clair**.



**Accroissement de la  
pousse du tronc des  
individus de peuplement**



**Allongement de la  
pousse du tronc des  
individus de **peuplement  
dense.****



Accroissement de la  
pousse du tronc des  
individus de **peuplement  
dense**.

