

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Aires d'étude et sélection des arbres

Les sites d'étude du sapin baumier et de l'épinette noire se trouvent dans la forêt d'enseignement et de recherche du Lac Simoncouche, à environ 25 km au sud de la ville de Chicoutimi, plus précisément dans la réserve faunique des Laurentides près du petit lac du Dépôt (Gagnon 1989). Ces deux sites se localisent dans la partie sud de la zone de répartition de la forêt boréale au niveau du domaine de végétation de la sapinière à bouleau blanc dans la province de Québec (Canada) (Gagnon 1989; Rouleau *et al.* 1990), ce qui correspond au milieu de l'aire de répartition de ces espèces. Les matériaux géologiques de surface sont des tills minces sur les interfluves ou épais dans les creux de terrain avec un sol en pente légère et bien drainé. Étant situé dans la région géologique du Bouclier Canadien, le relief y est vallonné et l'altitude varie entre 350 et 450 mètres (Gagnon 1989).

Deux sites distants l'un de l'autre d'environ 400 mètres ont été sélectionnés (Figure 1). Ceux-ci ont vraisemblablement été établis après le passage d'un feu qui aurait eu lieu au cours de l'année 1922 (Gagnon 1989). Le premier (Figure 2A) (48° 12' 44'' N, 71° 14' 27'' W) est composé d'un peuplement mixte à part égale de sapins baumiers et de peuplier faux-trembles. Ce site a été affecté par la tordeuse de bourgeons de l'épinette au cours des années 1940-1950. C'est après cette épidémie qu'il y a eu augmentation de la croissance de

la plupart des sapins baumiers qui dominent aujourd'hui le paysage. Le deuxième site (Figure 2B) ($48^{\circ} 12' 55''$ N, $71^{\circ} 14' 36''$ W) est en majeure partie composé d'épinettes noires matures. Le peuplement est composé de quelques autres espèces compagnes comme le peuplier faux-tremble, le sapin baumier et le bouleau à papier en faible pourcentage.

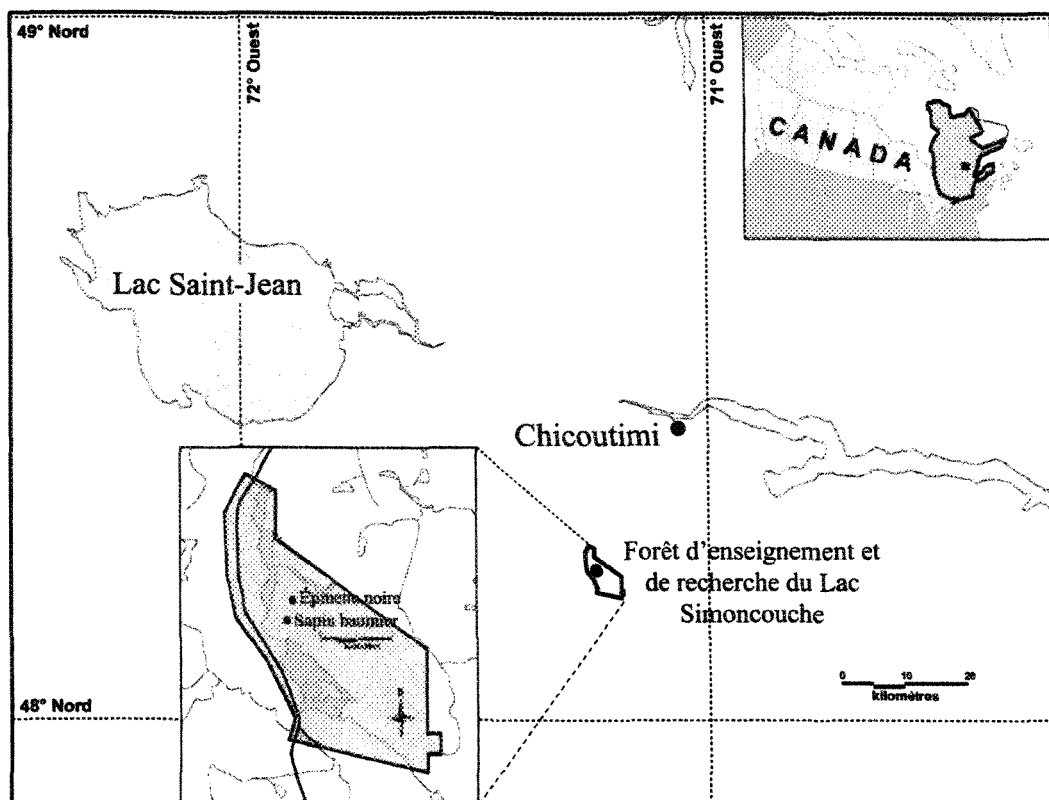


Figure 1 : Localisation des sites d'étude pour l'échantillonnage du sapin baumier et de l'épinette noire dans la forêt d'enseignement et de recherche du lac Simoncouche, Québec (Canada).

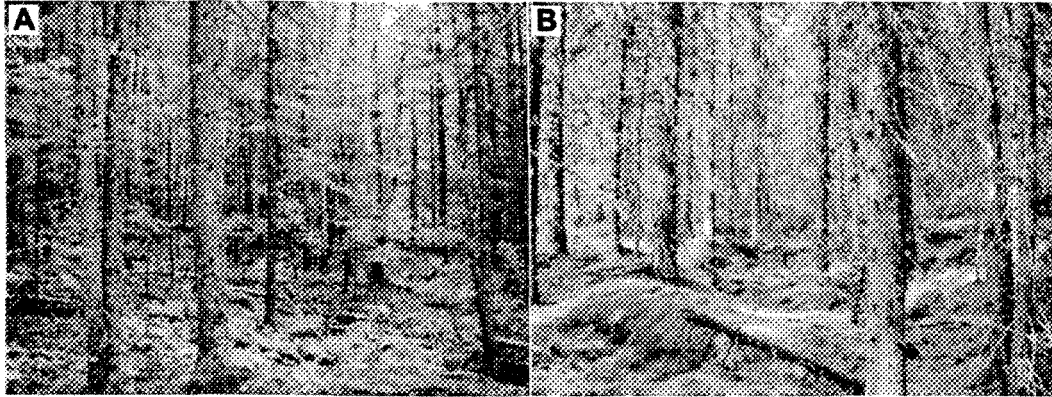


Figure 2 : Sites d'étude du sapin baumier (A) et de l'épinette noire (B).

Par espèce et par année, dix sapins baumiers et dix épinettes noires ont été sélectionnés subjectivement en fonction du nombre de cellules dans les cernes de croissance antérieurs des tiges. La sélection des dix individus de chaque espèce a été faite à partir d'une pré-sélection effectuée sur vingt individus de chaque espèce avant le début de la saison de croissance. Les individus matures qui présentaient une croissance homogène et des cernes plus larges, constitués de vingt trachéides et plus dans le xylème, ont été privilégiés.

En général, les deux espèces de conifère à l'étude ne possèdent que trois ou quatre racines principales à l'horizontale, proche de la surface, pouvant potentiellement faire l'objet d'une récolte de micro carottes sur l'ensemble d'une saison de végétation. L'échantillonnage répétitif utilisé semaine après semaine engendre un stress qui entraîne la formation de canaux résinifères, ce qui limite à une seule année la prise d'échantillons sur une racine d'un individu. Un total de vingt sapins baumiers a été récolté au cours des années 2005 et 2006 et un total de trente épinettes noires a été récolté au cours de la période 2004 à 2006. L'épinette noire a été étudiée une année de plus que le sapin baumier, soit en

2004, parce qu'elle avait fait l'objet d'une étude préliminaire visant à déterminer la possibilité de suivre la croissance intra annuelle du système racinaire. La hauteur et le diamètre à la hauteur de la poitrine (DHP) moyens des arbres récoltés (par espèces et années) sont résumés au tableau 1.

Tableau 1 : Moyennes et écarts types de la hauteur et du diamètre à la hauteur de la poitrine (DHP) des arbres échantillonnés.

Espèce	Année	Hauteur (m)	DHP (cm)
<i>Abies balsamea</i>	2005	14.4 ± 1.7	18.4 ± 1.3
	2006	14.0 ± 1.3	18.4 ± 2.3
<i>Picea mariana</i>	2004	17.9 ± 1.6	21.0 ± 2.7
	2005	17.7 ± 1.8	21.2 ± 2.5
	2006	15.3 ± 1.3	18.6 ± 2.5

2.2 Échantillonnage du cerne en formation

L'échantillonnage a été réalisé à chaque semaine en débutant au mois de mai pour se poursuivre jusqu'au début du mois de novembre. L'échantillonnage consistait à extraire des micro carottes de 2 mm de diamètre et d'environ 15-20 mm de longueur grâce à une aiguille d'aspiration DBMNI-1501 inter-V médical (instrument utilisé pour le prélèvement de moelle osseuse). Cette seringue a permis de prélever des micro carottes à répétition au niveau de la tige et de deux racines principales de dix sapins baumiers et dix épinettes noires dominants, tout en ne causant que des lésions mineures. Les micro carottes devaient inclure l'écorce pour s'assurer d'avoir la totalité de la zone cambiale et du cerne en formation. Les méthodes utilisées pour l'échantillonnage ont été différentes entre les deux parties de l'arbre (figure 3). Au niveau de la tige, les micro carottes ont été extraites autour

du tronc, en forme de spirale, à une hauteur d'environ 1,3 mètres, tout en distançant les prélèvements de 2 à 8 cm entre chaque semaine selon la méthode de Deslauriers *et al.* 2003. Cet espacement est nécessaire en raison de la possibilité de formation de tissus traumatiques à la périphérie des zones où a lieu l'échantillonnage (Forster *et al.* 2000). Cependant, cette méthode ne s'est pas appliquée à la racine car le cambium vasculaire de cette partie effectue une croissance excentrique qui produit plus de bois vers le côté extérieur, i. e. vers la surface du sol (Fayle 1968). Contrairement à la tige, le prélèvement au niveau du système racinaire a été effectué sur la partie supérieure de la racine à une distance de 25 cm de la souche en s'éloignant d'environ 2 à 3 cm les semaines suivantes. La plupart des arbres sélectionnés ont des racines horizontales près de la surface et sont recouvertes d'une mince couche de sol et de mousse. Il est donc nécessaire de les déterrer pour l'échantillonnage. Après une année complète d'échantillonnage, la portion des racines sur laquelle il est possible de prélever des micro carottes, soit jusqu'à une distance maximale d'environ 1,5 mètres de la souche, a été récoltée en entier. Au-delà de cette distance, la croissance chute considérablement et le diamètre des racines devient petit (Krause et Eckstein 1993). On doit alors changer d'arbre pour l'année suivante. Ensuite, les micro carottes provenant d'épinettes noires ont été entreposées dans une solution d'éthanol (50%), tandis que celles de sapins baumiers ont été laissées au sec à l'air ambiante, pour éviter la détérioration des tissus de la zone cambiale.

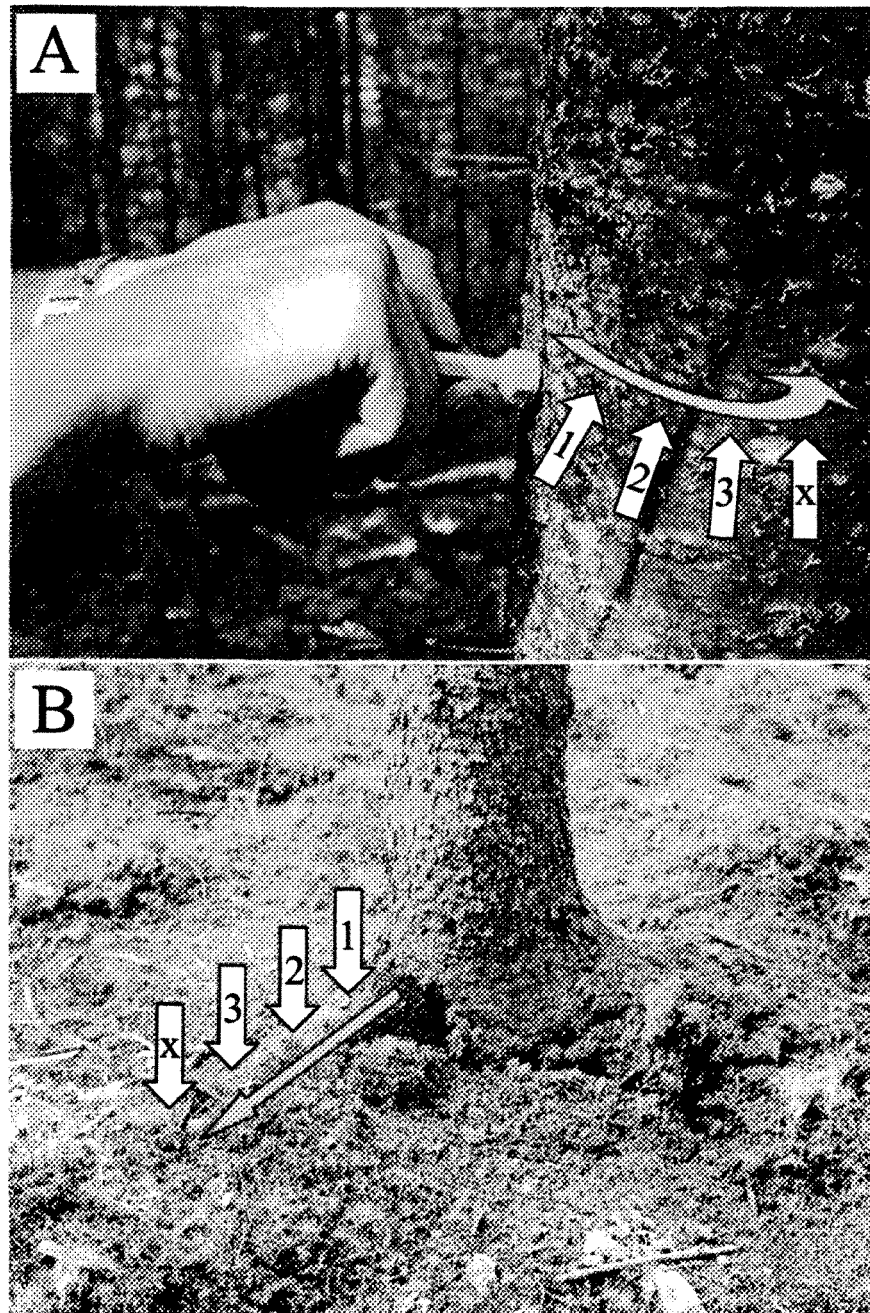


Figure 3 : Méthodologie utilisée pour prélever les micro carottes dans les tiges (A) et les racines (B). Les flèches blanches (numérotées 1, 2, 3 et x) et les flèches grises représentent respectivement l'ordre et la direction de la progression de l'échantillonnage dans le temps.

2.3 Analyses en laboratoire du cerne en formation

En laboratoire, les micro carottes ont été traitées dans un appareil de circulation à bain unique Histomatic Fisher Scientific dans diverses solutions (éthanol et Histo-Clear™) afin qu'elles se déshydratent et deviennent miscibles dans des blocs de paraffine selon la méthode de Deslauriers *et al.* (2003). Avec l'aide d'un microtome rotatif, 3484 échantillons ont été coupés en sections transversales d'une épaisseur de 7 µm, placés sur une lame avec de l'albumen et déparaffinés pour être colorés au crésyl fast-violet (0,05%) selon la méthode d'Antonova et Shebeko (1981). Par la suite, l'écorce a été étirée doucement à l'aide d'une aiguille fine pour que la zone cambiale ainsi que sa périphérie soient distinguables lors de l'observation. À l'aide du microscope à 200, 400 ou 500 × (selon la qualité des coupes) et sous une lumière polarisée, les stades de xylogenèse de chaque trachéide formée durant la période de végétation en cours ont été différenciés. Cette technique est utilisée fréquemment pour observer le processus de formation des parois secondaires des trachéides du xylème (Chaffey 2002b). Les trachéides du cerne en formation et de la zone cambiale sont dénombrées sur trois files radiales en fonction de leur stade respectif de xylogenèse (Abe *et al.* 1997; Rossi *et al.* 2003, 2006a; Dufour et Morin 2007). Pour chaque micro carotte échantillonnée, il y a eu dénombrement des cellules dans la zone cambiale, en élargissement radial, en formation des parois secondaires (lignification) ou à l'état mature (figure 4A).

La différenciation repose essentiellement sur des distinctions histologiques et morphologiques des trachéides, principalement dans la grosseur et la taille des cellules, ainsi que dans la couleur et l'épaisseur des parois cellulaires (Deslauriers *et al.* 2003;

Antonova et Shebeko 1981). Dans la zone cambiale, les cellules ont généralement une forme allongée et aplatie, de même qu'une paroi cellulaire très mince (Skene 1969; Antonova et Stasova 1993, 1997) (figure 4B à D). En début de saison, ces cellules de la zone cambiale seront très faciles à identifier (Riding et Little 1984, 1986 ; Deslauriers *et al.* 2003) (figure 4B), mais il est plus ardue de les différencier de celles en élargissement radial lorsque le cambium vasculaire est plus actif (figure 4C-D). La détermination du nombre de cellules dans la zone cambiale est parfois subjective et peut inclure les cellules initiales fusiformes indifférenciées du xylème et du phloème qui entreront éventuellement en élargissement radial (Bannan 1955; Kitin *et al.* 1999; Savidge 2000; Deslauriers *et al.* 2003; Rossi *et al.* 2006b). Les trachéides du xylème en élargissement radial (i. e. les initiales fusiformes) ont des parois cellulaires très minces et apparaissent violettes à la lumière polarisée (Kutscha *et al.* 1975) (figure 4E). Les trachéides en cours de lignification se caractérisent par une coloration violette avec apparence de rose (figure 4F). Par biréfringence, les trachéides qui possèdent une paroi cellulaire de micro fibrilles de cellulose scintillent en lumière polarisée, alors que celles en élargissement radial demeurent avec un aspect terne (Abe *et al.* 1997). Les trachéides matures auront une paroi cellulaire bleu foncé uniforme tout en conservant cet aspect de brillance (Antonova et Shebeko 1981) (figure 4G). Il est même possible d'y observer la paroi tertiaire.

Par ailleurs, le manque de synchronisme entre les files radiales d'une même micro carotte, de même qu'entre les micro carottes d'un même arbre et entre les arbres justifient l'utilisation de moyennes pour évaluer le début ou la fin de production de trachéides par le cambium vasculaire. Lors du dénombrement, il est fréquent d'observer une variabilité entre les files radiales d'une même coupe. Par exemple, dans certains cas, il n'y a qu'une file radiale sur trois qui possède une cellule classifiée en élargissement radial. Pour chaque partie (tige ou racine), espèce (*Abies balsamea* ou *Picea mariana*), année (2004, 2005 ou 2006) et arbre, les dates correspondant au début et à la fin de la période d'élargissement radial et de la lignification des trachéides ont été déterminées en fonction du nombre moyen de cellules dans l'une ou l'autre de ces phases de xylogénèse. Pour ces deux phases de xylogénèse, le début était déclaré lorsque le nombre moyen des trois files radiales était égale à 0,66 cellule alors que la fin était déclarée lorsque le nombre moyen des trois files cellulaires était pour une seconde fois égale à 0,66 cellule, soit deux files radiales sur trois ayant au moins une cellule dans une de ces phases de xylogénèse.

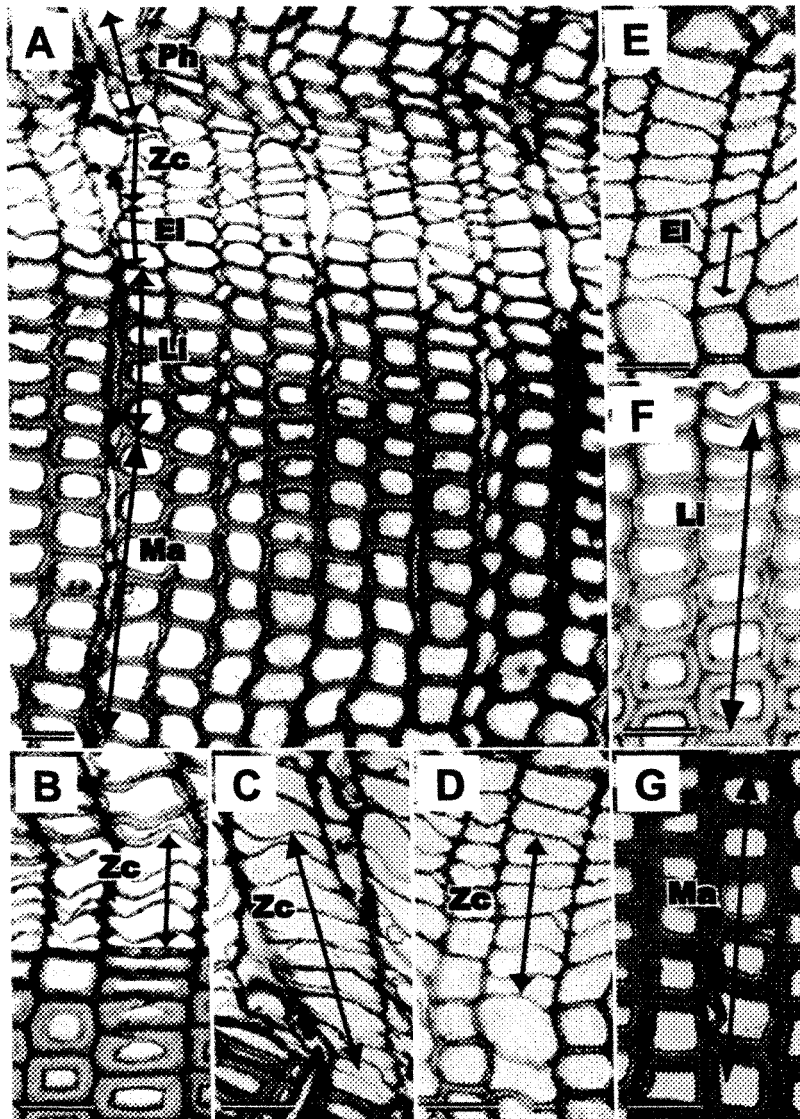


Figure 4 : A. Coupe transversale de la tige de *Picea mariana* (18/07/2005) ; trachéides matures (Ma), trachéides en lignification (Li), trachéides en élargissement radial (El), zone cambiale (Zc) et phloème (Ph) (200x). B. Zone cambiale (Zc) de la tige de *Picea mariana* en période de dormance (9/05/2005) (400x). C. Zone cambiale (Zc) de la tige de *Picea mariana* en période de division cellulaire (31/05/2005) (400x). D. Zone cambiale (Zc) de la tige de *Picea mariana* en fin de période de division cellulaire (18/07/2005) (400x). E. Trachéides de la tige de *Picea mariana* en élargissement radial (El) (400x). F. Trachéides de la tige de *Picea mariana* en lignification (Li) (400x). G. Trachéides de la tige de *Picea mariana* matures (Ma) (400x). — Barres échelles = 20 μ m.

Lors des différentes manipulations (prélèvement, coupe, coloration etc.) il est très facile d'endommager les échantillons et de les rendre inutilisables à des fins d'analyses (Kitin *et al.* 2000). Toutes ces difficultés techniques ont entraîné la perte d'une certaine partie des échantillons récoltés. Le tableau 2 reporte le pourcentage du nombre d'échantillons qui ont pu être utilisés pour l'une ou l'autre des phases de xylogénèse selon l'année, la partie ou l'espèce. Sur une disponibilité totale de 3484 micro carottes, 2889 micro carottes ont pu être utilisées à des fins d'analyses. La zone cambiale peut être très fragile pendant la réactivation cambiale printanière et des déchirures des parois cellulaires lors des manipulations peuvent être fréquentes. Ainsi, le décompte du nombre de trachéides en xylogénèse peut être compromis. Bien que dans plusieurs cas la zone cambiale soit abîmée, il a toutefois été possible d'y dénombrer les trachéides en élargissement radial, les trachéides en lignification ou les trachéides matures car celles-ci n'ont pas été détériorées. Lors de l'analyse, l'endommagement des coupes cellulaires ainsi que la perte du décompte des cellules de la zone cambiale, sont survenus plus fréquemment au niveau des racines, comparativement aux tiges, de même que chez *Abies balsamea* versus *Picea mariana*. Par exemple, le nombre de cellules dans la zone cambiale a pu être compté chez seulement 56% des coupes cellulaires des racines d'*Abies balsamea* et 74% de celles de *Picea mariana*. 65% des coupes cellulaires des tiges de *Abies balsamea* et 81% de celles de *Picea mariana* ont pu faire l'objet d'un décompte de cellules dans la zone cambiale. Pour les trois phases de xylogénèse, le nombre de coupes cellulaires analysables a été supérieur à 82%.

Tableau 2 : Rapport (r) en pourcentage (%) = (nombre d'échantillons utilisé (n) / nombre d'échantillons total (t)) pour chacune des phases de xylogénèse. Zc = Zone cambiale; El = Élargissement radial; Li = Lignification; Ma = Mature; To = Total

Partie	Espèce	Année	t	Phases de xylogénèse									
				Zc		El		Li		Ma		To	
				n	r (%)	n	r (%)	n	r (%)	n	r (%)	n	r (%)
Tige	<i>Abies balsamea</i>	2005	260	174	67	181	70	196	75	196	75	181	70
		2006	270	172	64	256	95	264	98	264	98	256	95
		Total	530	346	65	437	82	460	87	460	87	437	82
	<i>Picea mariana</i>	2004	125	103	82	104	83	112	90	112	90	104	83
		2005	261	207	79	206	79	210	80	209	80	206	79
		2006	270	223	83	259	96	268	99	265	98	258	96
Total		656	533	81	569	87	590	90	586	89	568	87	
Racine	<i>Abies balsamea</i>	2005	530	339	64	363	68	389	73	394	74	352	66
		2006	560	273	49	528	94	538	96	538	96	526	94
		Total	1090	612	56	891	82	927	85	932	86	878	81
	<i>Picea mariana</i>	2004	125	98	78	100	83	107	86	108	86	100	80
		2005	525	393	75	397	76	407	78	401	76	388	74
		2006	558	405	73	522	94	534	96	532	95	518	93
		Total	1208	896	74	1019	84	1048	87	1041	86	1006	83

2.4 Standardisation

La première étape consistait à standardiser le nombre de trachéides pour l'une ou l'autre des phases de la xylogénèse afin d'établir les comparaisons des moyennes entre les tiges et les racines d'*A. balsamea* et de *P. mariana* au cours des années 2004 à 2006. Cette standardisation avait comme objectif d'éliminer la variabilité dans la croissance au niveau de la circonférence de la tige de l'arbre (Rossi *et al.* 2003 ; Schmitt *et al.* 2004) ainsi qu'au niveau de la croissance hétérogène qu'il y a sur toute la longueur de la racine (Krause et Morin 1998, 1999). En effet, le nombre de cellules produites par le cambium vasculaire dépend de sa position sur l'arbre (Larson 1994 ; Vaganov *et al.* 2006). La méthode utilisée consistait à établir un ratio entre le nombre moyen de cellules des trois files radiales pour

chaque échantillon et le nombre moyen de cellules totales de tous les échantillons produits durant toute l'année au sein d'une même partie d'un même arbre (Rossi *et al.* 2003). Le nombre de cellules standardisées dépendra de sa position relative sur l'arbre :

Équation 1 : Calcul du nombre de cellules standardisées.

$$nc_{ij} = n_{ij} \times \frac{am}{a_j}$$

$$am = \frac{\sum_{j=1}^N a_j}{N}$$

nc_{ij} = Nombre de cellules standardisées.

n_{ij} = Nombre de cellules observées.

N = Nombre de jours d'échantillonnage.

a_j = Nombre moyen de cellules dans les cernes antérieurs pour chaque jours d'échantillonnage.

am = Nombre moyen de cellules dans les cernes antérieurs pour tous les jours d'échantillonnage au sein d'une même partie d'un même arbre.

2.5 Analyse de variance

Pour comparer les résultats (début, fin et durée) de chacune des phases de xylogénèse (élargissement radial et formation des parois secondaires des trachéides du xylème) entre les tiges et les racines d'*A. balsamea* et de *P. mariana* au cours des années établies, une

analyse de variance univariée multi facteurs a été effectuée (ANOVA) avec un seuil de signification de $P= 0,05$. Un test statistique similaire a été effectué afin de comparer le nombre moyen de trachéides totales produites par le cambium vasculaire. Lors des analyses, trois facteurs hiérarchisés ont été fixés : l'espèce (*A. balsamea* ou *P. mariana*), la partie (tige ou racine) et les années (2004, 2005 et 2006). L'homogénéité des variances a été vérifiée graphiquement en évaluant les distributions des valeurs résiduelles du modèle linéaire en fonction des valeurs estimées (Montgomery 1991). Aucune transformation des données n'a été nécessaire car le postulat de l'homogénéité des variances a été respecté et il y a eu normalité de la distribution dans tous les cas (Quinn et Keough 2002). Toutefois, ce modèle se retrouve non équilibré en raison du nombre d'échantillons différents entre les combinaisons de facteurs, en particulier dans les racines où les effectifs sont plus élevés que dans les tiges. Il a donc été nécessaire d'utiliser les procédures GLM (General Linear Models Procedure dans SAS Institute Inc. 1999-2000) pour contrer cette problématique (Shaw et Mitchell-Olds 1993).

2.6 Modélisation de la croissance du xylème

La production de trachéides a été modélisée avec l'aide d'une régression non linéaire selon l'équation du modèle de Gompertz (Rossi *et al.* 2003, 2006c) pour établir une courbe de l'augmentation du nombre de trachéides totales avec l'aide des procédures Nonlinear (Gompertz growth model) du logiciel statistique JMP® IN 5.1 (SAS Institute Inc.). De façon générale, les modèles sigmoïdes tel que le modèle de Gompertz, sont très employés en biologie végétale car la tendance générale de la variable expliquée en fonction

du temps en abscisse prends souvent la forme d'un nuage en "S" (Cusset 1991). En plus, plusieurs auteurs ont appliqués le modèle de Gompertz pour étudier la dynamique de croissance intra annuelle d'espèces de conifères (Camarero *et al.* 1998; Mäkinen *et al.* 2003; Rossi *et al.* 2003, 2006c). Pour chaque association de facteurs (espèces, parties et années), les paramètres de la courbe de croissance (A , β et κ) ont été estimés en minimisant la somme du carré des écarts entre le nombre de trachéides totales observées et le nombre de trachéides totales estimées afin d'établir le R^2 du modèle. Ces paramètres A , β et κ ont la particularité de définir la forme générale de la courbe du modèle de Gompertz et permettent de décrire les ressemblances et les différences dans la croissance entre les différents facteurs. L'équation du modèle de Gompertz peut être définie ainsi :

Équation 2 : Calcul du nombre de trachéides totales cumulées avec l'équation de Gompertz.

$$Y = A \exp [-e^{(\beta - \kappa t)}]$$

Y = Nombre de trachéides totales cumulées

t = Temps (en jours juliens)

A = Asymptote ou plateau (Nombre maximal de trachéides)

β = Paramètre de placement de la courbe sur l'abscisse

κ = Paramètre de vitesse de croissance

2.7 Données météorologiques

Une station météorologique équipée d'un module de mesure et de contrôle CR10X (Campbell Scientific Canada Corp.) a été installée en 2000 à une distance de 1.75 km des deux sites à l'étude (48° 13' 46'' N, 71° 15' 09'' W). Ce système a permis d'enregistrer et de regrouper des données météorologiques à toutes les 5 minutes. Le climat de la région est de type continental tempéré, avec des hivers froids et des étés chauds. La température de l'air minimale, moyenne et maximale ($T_{min.}$, $T_{moy.}$, $T_{max.}$; °C) ainsi que la somme des précipitations ont été mesurées avec l'aide d'un senseur installé à une hauteur de 2 mètres.

2.8 Seuils de température de l'air

Des régressions logistiques ont servi à calculer la probabilité de retrouver des trachéides classifiées en élargissement radial dans le xylème (i. e. présence de xylogenèse) à une température de l'air donnée (Rossi *et al.* 2007). Elles ont été calculées avec l'aide du logiciel SAS (LOGISTIC procedure). L'équation servant à établir les régressions se définit ainsi:

Équation 3 : Calcul des seuils de température avec l'aide de régressions logistiques.

$$\text{Logit}(\pi_x) = \ln(\pi_x / 1 - \pi_x) = \beta_0 + \beta_1 x_j$$

π_x = Probabilité que la xylogenèse soit active

x_j = Température donnée à chaque jour

β_0 et β_1 = Ordonnée à l'origine et coefficient de régression (pente)

Lors de cette procédure, des réponses binaires (codages quantitatifs) sont obtenues en fonction de la présence (valeur 0) ou de l'absence (valeur 1) de trachéides classifiées en élargissement radial, en association avec une température (x_j) à une journée donnée (j), quand β_0 et β_1 sont l'ordonnée à l'origine et la pente de la régression logistique (Quinn et Keough 2002). Les valeurs obtenues correspondent à des seuils de température et sont calculées quand la probabilité de retrouver des trachéides en élargissement radial est égale à 0.5 (valeur médiane de 50%), i. e. quand $\text{Logit}(\pi) = 0$ et $x = -\beta_0/\beta_1$. Ces seuils de température correspondent à des valeurs auxquelles on considérera qu'il y a 50% de probabilité que le cambium vasculaire soit actif (i. e. que l'on retrouve des trachéides classifiées en élargissement radial dans le xylème). Le modèle a été calculé pour chaque arbre, partie (tiges ou racines), espèce (*Abies balsamea* ou *Picea mariana*) et année (2004, 2005 ou 2006) avec les températures minimales ($T_{\min.}$), moyennes ($T_{\text{moy.}}$) et maximales ($T_{\max.}$) de l'air ambiant, ce qui a permis d'obtenir un total de 372 modèles. Il aurait été intéressant d'obtenir les seuils avec les températures du sol, mais les données n'étaient pas fiables et il a été préférable de ne pas les utiliser. Aussi, aucune relation n'a pu être établie entre les précipitations et la formation du xylème. Pour comparer les seuils de température entre les parties, les espèces et les années, une analyse de variance univariée multi facteurs a été effectuée (ANOVA) avec un seuil de signification de $P = 0,05$.