



HAL
open science

Étude de la sensibilité du hêtre lorrain à un événement climatique extrême. Quels sont les rôles des métabolismes carboné et azoté dans la mort des arbres ?

Pierre-Antoine Chuste

► To cite this version:

Pierre-Antoine Chuste. Étude de la sensibilité du hêtre lorrain à un événement climatique extrême. Quels sont les rôles des métabolismes carboné et azoté dans la mort des arbres ?. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0255 . tel-02104092

HAL Id: tel-02104092

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02104092>

Submitted on 19 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité Biologie Végétale et Forestière par

CHUSTE Pierre-Antoine

Etude de la sensibilité du hêtre lorrain à un événement climatique extrême.
Quels sont les rôles des métabolismes carboné et azoté dans la mort des arbres ?

Membres du jury

Dr. Hendrik Davi, Directeur de recherche, INRA Avignon

Rapporteur

Dr. Marie-Pascale Prud'homme, Professeur, INRA Caen

Rapporteur

Pr. Yves Jolivet, Professeur, Université de Lorraine

Examineur

Dr. Thierry Améglio, Directeur de recherche, INRA Clermont-Ferrand

Examineur

Dr. Pascale Maillard, Chargée de recherche, HDR, INRA Grand-Est

Directrice de thèse

Dr. Catherine Massonnet, Chargée de recherche, INRA Grand-Est

Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Marie-Pascale Prud'homme**, **Hendrik Davi**, **Yves Jolivet** et **Thierry Ameglio**, membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à mes encadrantes, **Pascale Maillard** et **Catherine Massonnet**. Merci pour toutes les compétences que vous m'avez transmises, pour votre réactivité à répondre à mes questions, pour vos encouragements mais surtout pour votre côté humain, ce qui est rare et précieux dans ce milieu. Merci pour tout.

Je remercie également les membres extérieurs de mon comité de thèse, **Alexia Stokes** et **Eric Dufrêne** pour leurs précieux conseils.

Merci à **Nathalie Bréda** pour les conseils scientifiques et personnels que tu m'as prodigués tout au long de mon doctorat, vraiment un grand merci.

Dominique Gérant, merci pour tout également, ton aide et tes conseils m'ont été plus que précieux tout au long de cette aventure.

Merci à toi **Jean-Marc Guehl** qui, malgré des goûts footballistiques douteux, m'a accompagné au long de ces années à l'INRA.

Merci aux personnes du LABEX Arbre d'avoir financé mon travail de thèse mais surtout à **Francis Martin**, **Pascale Frey-Klett** et **Nathalie Carol**.

Merci aux autres financeurs de ces travaux que sont le FEDER et la Région Lorraine.

Merci à toutes les personnes de feu l'UMR 1137 et les autres à savoir (par ordre alphabétique comme ça pas de jaloux), **Adeline** (merci pour ta patience avec ma phobie administrative), **Alwin** (toi qui t'es envolé vers les contrées belges, merci d'avoir fait vivre le labo via tes sorties cinéma ou EuropaPark), **Agnès** (merci pour tout, ta bonne humeur quand tu apparaissais dans le bureau), **Bastien** (pour tes conseils précieux pour les dosages biochimiques), **Patrick alias BBR'** (les blind test par mail interposé mais aussi tes blagues pas toujours drôles mais tu faisais du mieux que tu pouvais), **Bernd** (tout paraît simple, merci pour tout), **Bruno** (j'espère que tu râles moins à l'ONF, en tout cas tu n'as pas un Jeremy pour te coller ta souris), **Carole** et **Christian** (merci pour tout cet azote liquide fourni et les conseils prodigués, c'était super d'avoir fait votre rencontre), **Cyril** (tu m'as presque fait aimer Pearl Jam, faut bien le reconnaître), **Damien** (merci pour les conseils que tu m'as donnés, j'ai beaucoup apprécié ton côté humain), **David** (hé hé bonne chance le thésard et merci pour toutes ces années passées au

centre), **Didier** (merci pour tout vraiment, et également pour la petite glace ramenée par ta femme lors d'une longue journée de cinétique pendant le stage M1), **Erwin T.** (houlà, trop de choses à dire, même si tu voulais littéralement ma mort lors des campagnes de potentiels de base, t'es quelqu'un de formidable), **Erwin D.** (merci pour ta gentillesse et l'aide que tu as toujours su m'apporter), **Erwin Dreyer** (pour les conseils prodigués tout au long de mon passage à l'INRA mais aussi pour m'avoir pris en stop un jour de grand froid), **Franck** (tes conseils en informatique m'ont bien servi puis tes conseils en musculation aussi ont fait de moi l'être si musclé que je suis aujourd'hui), **Francois** (tu avais l'énorme mérite d'arriver à faire passer les campagnes de phénologie foliaire rapidement, merci pour tout), **Irène** (derrière ton caractère de Godzilla en fait c'est un petit tigre qui se cache mais chut, il ne faut pas le dire), **Jaja** (quand tu liras ces lignes, tu seras sûrement déjà en retraite, profite en bien, tu le mérites 1000 fois !), **Jeremy** (un goût footballistique certain, tu m'auras bien fait rire à la cantine avec tes blagues incessantes), **Jean-Luc** (merci pour tous les conseils), **Joseph** (merci pour tout, ces 3 années nous aurons amené à nous voir aussi bien devant du hêtre collant qu'au premier rang de concert), **Justine** (merci de m'avoir ouvert à la médiation scientifique, pour ta gentillesse et ta disponibilité), **Laurence** (merci pour tous tes conseils, j'ai beaucoup apprécié te connaître), **le Lu** (Monsieur Bière, tu es content d'être nommé comme ça hein ? heureusement que je ne t'ai pas nommé par ton vrai nom, hein Christ.), **Manon** (merci pour tout ce que tu as fait), **Marie-Béa** (merci pour tous les conseils avisés que tu as pu me fournir, promis je ne dis plus sucrose mais saccharose), **Maryline** (quelle grande personne que tu es, les pauses cafés du midi avec toi c'était top), **Matthias** (je ne t'ai pas connu très longtemps mais tu es quelqu'un auprès de qui on apprend beaucoup en plus d'être super sympa ! Danke Shoen !), **Nico A.** (j'ai failli écrire quelque chose de méchant sur toi mais tu m'as rendu mon jeu de plateaux donc ça va, ne changes pas en tout cas, j'ai rarement connu quelqu'un d'aussi juste et sympa que toi), **Nico M.** (merci pour toutes les discussions que l'on a eues), **Oliver** (malgré le fait que tu m'aie forcé à regarder ce chef d'œuvre cinématographique que constitue Pixel, tu es super, ne changes surtout pas !), **Patrick** (on t'avait présenté à moi comme le monsieur grognon qu'il ne faut pas trop déranger, écoute, je t'ai toujours trouvé sympa et à l'écoute, comme quoi les on dit hein), **Pierrick** (merci pour tout, pour les conseils et avant tout pour ton côté humain), **Pierre** (merci pour tout, merci pour avoir essayé de m'initier à la reconnaissance du chant des oiseaux, merci d'avoir accru ma connaissances de l'opéra et enfin, merci de m'avoir amené à l'INRA quotidiennement avec ton vieux pot de yaourt... ta formidable voiture), **Rémi** (merci pour tout à toi avec qui l'on cherchait désespérément une boulangerie ouverte à 4h30 du matin pour acheter des pâtés lorrains à la sortie d'une campagne de potentiels de base), **Stéphane** (merci

pour tous les conseils et ta disponibilité), **Vincent** (merci également pour tout jusqu'à la fin pour ces contacts avec le Québec).

Merci aux nombreux anonymes de la communauté R qui m'ont bien aidé.

Merci aux **copains du bus** d'avoir rendu le chemin Champenoux-Nancy moins monotone surtout sur celui de 18h06, on n'était pas nombreux mais on rigolait bien.

Merci à **Elisé, Lyes, Hamza, Anthony** pour m'avoir aidé pour toutes ces longues étapes de broyage, pesées et mises en eppendorf, au final plus de 8000 échantillons, c'est pas si pire !

Merci aux élèves du **collège d'Einville-au-Jard** de nous avoir aidé pour les séquences de défoliation et félicitations d'avoir gagné le concours !

Merci à ceux sans qui cette thèse n'aurait pas été possible, je veux bien entendu parler de X1Y47, X2Y17, X3Y46, X5Y29, X6Y3, X7Y2, X9Y41, X10Y42, X11Y13, X11Y42, X13Y31, X15Y30, X18Y17, X18Y46, X19Y17, X21Y29, X21Y31, X23Y3, X1Y19, X2Y18, X2Y46, X2Y48, X3Y19, X6Y31, X9Y14, X11Y41, X11Y44, X14Y30, X14Y42, X15Y31, X17Y19, X19Y18, X19Y46, X21Y2, X22Y32, X23Y29, X3Y20, X3Y47, X5Y1, X5Y26, X6Y2, X6Y4, X6Y29, X6Y56, X7Y6, X7Y17, X7Y18, X7Y30, X9Y13, X11Y14, X13Y41, X13Y44, X15Y32, X15Y43, X17Y46, X18Y19, X18Y45, X19Y19, X22Y4, X23Y32, X5Y25, X5Y27, X5Y46, X5Y47, X5Y52, X6Y36, X6Y49, X7Y10, X9Y20, X9Y30, X10Y36, X13Y12, X13Y25, X17Y43, X22Y9, X23Y36, X23Y46.

Merci à tous les copains de Lorraine et du Nord pour avoir été là en fait, par ordre alphabétique (toujours pas de jaloux), **Aline, Camille, Chvan, Clément, Erwin T.** (tu es mis à deux endroits toi), **Estelle, Felix, JB, Maud, Max B., Max D., Mégane, Nico, Théo B.** C'est difficile de mettre un mot à côté de chacun de vous tant vous constituez mon socle lorrain, nordiste et personnel, je ne vous remercierais jamais assez d'avoir été là.

Merci à ma petite mais précieuse famille de m'avoir mis au monde, c'est plutôt une bonne chose d'être sur Terre, merci à vous, du fond du cœur. Vous m'avez toujours poussé à être curieux, vous m'avez apporté tellement de chose, vous m'avez toujours soutenu dans tous mes choix, même les plus audacieux alors merci pour tout.

Merci au **Dr. Jump R.** de m'avoir écouté et épaulé malgré que tu ne fusses pas toujours de bon poil.

Enfin, merci à ma précieuse, à ma chère et tendre **Sarah** de m'avoir supporté et de me supporter durant ces longues années. On en rigolera bientôt. Je ne dirais pas ce qu'il doit censé suivre mais tu as compris l'idée (note : ceci ne constitue pas une demande).

Ps: merci à **vous/toi** qui a lu tous les remerciements, c'était la partie sympa et fun à lire, le reste le sera un peu moins et n'hésites(z) pas à me contacter ou mes encadrantes si tu/vous as/avez besoin de plus d'informations.

Liste des valorisations

ARTICLES ACADEMIQUES EN PREPARATION OU SOUMIS

Chuste, P.A., Massonnet, C., Gérant, D., Zeller, B., Levillain, J., Hossan, C., Angeli, N., Wortemann, R., Bréda, N., Maillard, P., *Short-term nitrogen dynamics are impacted by defoliation and drought in Fagus Sylvatica L.*, accepté pour Tree Physiology.

Chuste, P.A., Maillard, P., Marchand, J., Bréda, N., Levillain, J., Wortemann, R., Massonnet, C., *Dynamics of non-structural carbohydrates (NSC) in 10 years-old Fagus Sylvatica L. youngest branches following experimental drought or defoliation. Special focus on drought related mortality.*, en préparation pour Annals of Forest Science.

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Levillain, J., Tillard, P., Thirion, E., Wortemann, R., Bréda, N., Maillard, P., *Seasonal translocation of foliar nitrogen within beech trees and its tolerance to stress: a ¹⁵N labelling approach*, en préparation pour Physiologia Plantarum.

Chuste, P.A., Maillard, P., Gerard, B., Levillain, J., Thirion, E., Wortemann, R., Bréda, N., Massonnet, C., *What role does storage function play in the death of Fagus Sylvatica L. trees ?*, en préparation pour Journal of Experimental Botany.

POSTER

Chuste, P.A., Massonnet, C., Maillard, P., *What roles of carbon and nitrogen metabolisms in the death of beech trees?* Présenté au Xylem Meeting 2015, Bordeaux (France).

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Hossan, C., Wortemann, R., Maillard, P., *Drought and defoliation impacts on nitrogen dynamics of 10 years-old beech trees*, présenté au Jesium 2016, Gent (Belgique)

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Hossan, C., Wortemann, R., Maillard, P., *Drought and defoliation impacts on nitrogen dynamics of 10 years-old beech trees*, présenté à la journée des doctorants et post-doctorants du LABEX Arbre 2016, Champenoux (France)

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Hossan, C., Wortemann, R., Maillard, P., *Drought and defoliation impacts on nitrogen dynamics of 10 years-old beech trees*, présenté au séminaire annuel de l'école doctorale RP2E 2016, Nancy (France)

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Bréda, N., Tillard, P., Wortemann, R., Thirion, E., Maillard, P., *Whole-tree nitrogen dynamics accross season in response to defoliation in 10 year-old beech trees* présenté au colloque IPNC en 2017, Copenhague (Danemark).

COMMUNICATIONS ORALES

Chuste, P.A., Maillard, P., Bréda, N., Marchand, J., Massonnet, C., *Dynamics of non-structural carbohydrates in 10 years-old beech following long-term experimental drought and defoliation* présenté à la journée des doctorants et post-doctorants du LABEX Arbre 2016

Chuste, P.A., Maillard, P., Bréda, N., Wortemann, R., Thirion, E., Massonnet, C., *What role does storage function play in the death of beech trees?* Présenté au colloque IUFRO 2017, Freiburg (Allemagne)

Chuste, P.A., Massonnet, C., Zeller, B., Bréda, N., Tillard, P., Wortemann, R., Thirion, E., Maillard, P., *Whole-tree nitrogen dynamics accross season in response to defoliation in 10 year-old beech trees* présenté au colloque IPNC en 2017 (3 minutes speaker corner), Copenhague (Danemark).

VALORISATION A BUT DE VULGARISATION SCIENTIFIQUE AU GRAND PUBLIC

Intervention dans un collège à Einville-au-Jard (54) dans le but de les aider à construire une maquette sur la mortalité des arbres dans le cadre d'un concours inter-collège au niveau régional (Prix reçu).

Participation à la formation donnée par l'Ecole Doctorale nommée « Experimentarium » : conception d'un atelier destiné à expliquer mon travail de thèse à des enfants de CM1/CM2.

Participation à une journée de l'orientation à Thionville (57) afin d'expliquer à des lycéens le travail de doctorant.

Organisation et présentation de l'évènement « Pint Of Science » à Nancy en Avril 2017.

Participation à la finale régionale de « Ma Thèse en 180 secondes » en 2016.

Réalisation et présentation d'un atelier lors des portes ouvertes de l'INRA en 2016.

Réalisation et présentation d'un atelier lors de l'arrêt du « Train du climat » en gare de Nancy en 2015.

Participation à une session de questions-réponses sur une web-radio tenue par un collègue.

Sommaire

CHAPITRE 1 : Introduction

1.1. Changements climatiques et écosystèmes forestiers.....	2
1.2. Notion de dépérissement: processus mis en jeu.....	4
1.3. Le hêtre, une espèce décidue menacée.....	7
1.4. Objectifs de ce travail de thèse.....	8

CHAPITRE 2 : Synthèse bibliographique

2.1. Pourquoi considérer le fonctionnement hydraulique de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte ?.....	11
2.2. Pourquoi considérer le métabolisme carboné de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte ?.....	14
2.3. Pourquoi considérer le métabolisme azoté de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte ?	23
2.4. Comment améliorer notre compréhension des processus menant à un phénomène de mortalité ?.....	30

CHAPITRE 3 : Construction de ce travail de thèse.....35

CHAPITRE 4 : Matériels et méthodes.

4.1. Description du site expérimental avant la mise en place des traitements.....	40
4.2. Mise en place et suivi des traitements.....	42
4.3. Phase expérimentale de terrain.....	49
4.4. Phase de préparation des échantillons pour les analyses.....	59
4.5. Phase expérimentale de laboratoire.....	60
4.6. Analyses statistiques.....	66

CHAPITRE 5, Article 1: Dynamics of non structural carbohydrates (NSC) in 10 year-old Fagus Sylvatica L. youngest twigs following experimental defoliation or drought which induced mortality

5.1 Introduction.....	73
5.2. Material and methods.....	76
5.3. Results.....	80
5.4. Discussion.....	88
5.5. Conclusion.....	91

CHAPITRE 6, Article 2: Short-term nitrogen dynamics are impacted by defoliation and drought in *Fagus Sylvatica* L. branches

6.1. Introduction	96
6.2. Material and methods	98
6.3. Results	104
6.4. Discussion	116
6.5. Conclusion	120

CHAPITRE 7, Article 3: Seasonal translocation of foliar nitrogen within beech trees and its tolerance to stress: a ¹⁵N labeling approach

7.1. Introduction	125
7.2. Material and methods	128
7.3. Results	134
7.4. Discussion	147
7.5. Conclusion	151

CHAPITRE 8, Article 4: What role does storage function play in the death of *Fagus Sylvatica* L. trees?

8.1. Introduction	155
8.2. Material and methods	158
8.3. Results	162
8.4. Discussion	172
8.5. Conclusion	175

CHAPITRE 9 : Retour d’expérience, discussion générale et conclusions

9.1. Retour d’expérience sur le dispositif expérimental.....	177
9.2. Discussion générale.....	179
9.3. Conclusions.....	189

CHAPITRE 10 : ANNEXES

Liste bibliographique.....	202
Liste des figures.....	231
Liste des tableaux.....	241
Résumé/Abstract.....	244

« La forêt se dérobe à la lumière et c'est ainsi qu'elle dure. Certes elle assimile les richesses du soleil, mais les transforme, les élabore, les conserve. Il y a une grande force dans ce retrait, dans ce recueillement. Je voudrais être un arbre, un arbre qui marche. »

Jacques de Bourbon Busset (écrivain, 1912-2001)

AVANT PROPOS

Cette thèse a été effectuée au centre INRA Grand Est de Champenoux (54, France) dans l'unité SILVA. La bourse de thèse a entièrement été financée par le LABEX ARBRE.

Ce manuscrit est composé de 9 chapitres (+ 1 d'annexes) avec une synthèse bibliographique et un matériel et méthode écrits en français. Les chapitres 4 à 8 sont constitués chacun d'un article accepté ou en préparation écrit en anglais. Enfin, une discussion générale reprenant les principales avancées permises par ce travail constitue le chapitre 9.

L'ensemble de ces travaux étaient supervisés par Pascale MAILLARD (CR, INRA Grand-Est) et Catherine MASSONNET (CR, INRA Grand-Est) et ont été co-financés par le programme « Investissement d'Avenir » [ANR-11-LABX-002-01] du LABEX ARBRE, par la région Lorraine et le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

Enfin, il est important de préciser que ce travail faisait partie intégrante d'un projet multidisciplinaire, le projet Mepib-Death (Morphological and Ecophysiological processes involved in Beech tree death) porté par Nathalie BREDA.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1. Changements climatiques et écosystèmes forestiers

La température à la surface de la Terre ne cesse d'augmenter depuis le début du XX^{ème} siècle (+0.85°C) et, depuis les années 80, ce réchauffement s'est accéléré (rapport du GIEC, 2013). La température terrestre a atteint des niveaux inédits au cours de chacune des trois dernières décennies (1980, 1990, 2000) (rapport du GIEC, 2013). L'homme n'est pas étranger à cette augmentation soudaine des températures. En effet, la combustion d'énergies fossiles, fruit de l'activité industrielle humaine, produit du CO₂ qui est le second gaz à effet de serre après la vapeur d'eau.

Les forêts, grâce à la photosynthèse, compensent en partie ces émissions par des flux de CO₂ depuis l'atmosphère. Les écosystèmes forestiers capturent le carbone atmosphérique et le stockent dans le sol et sa biomasse. Par conséquent, les forêts sont un « puits de carbone » important puisqu'elles stockent 861,1 gigatonnes de carbone (Lousteau et Bosc, 2012), respectivement répartis dans la biomasse vivante (42%), le bois mort (8.5%) et dans la litière (49.5%) (Lousteau et Bosc, 2012).

En Europe, les forêts représentent également un puits de carbone important (Nabuurs *et al.*, 2003 ; Loustau, 2010) avec une production primaire nette (NPP) en augmentation de 67% au cours des 50 dernières années (Ciais *et al.*, 2008). Cette augmentation provient majoritairement d'une meilleure gestion forestière faite en concertation avec les acteurs de la recherche forestière.

Une conséquence des changements climatiques (CC) est une hausse des températures et celle-ci peut avoir une incidence sur la phénologie. En effet, une augmentation de la température dans les zones tempérées peut avancer la date de débourrement et/ou reculer la sénescence (Lebourgeois *et al.*, 2010 ; Migliavacca *et al.*, 2012) et par conséquent, augmenter la durée des saisons de végétation. Des saisons de végétations plus longues engendreraient un décalage dans le début et la fin de l'assimilation carbonée et une augmentation de l'accumulation de la biomasse (Migliavacca *et al.*, 2012 ; Richardson *et al.*, 2013). En effet, lors d'une étude réalisée au moyen de tours à flux sur plus de 25 sites, Churkina *et al.* (2005) ont montré qu'une relation existe entre la production nette de l'écosystème et la durée de la saison de végétation.

Cependant, à court et moyen termes (horizon 2020-2050, prévision GIEC, rapport 2013), les effets des CC pourraient inverser cette tendance positive sur la productivité forestière (Dezi *et al.*, 2010). Il est quasiment certain que les températures extrêmes chaudes seront plus élevées

au fur et à mesure de l'augmentation de la température moyenne du globe et il est aussi très probable que les vagues de chaleur seront plus fréquentes et dureront plus longtemps, de même que les vagues de froid (**Figure I.1**, rapport du GIEC, 2013).

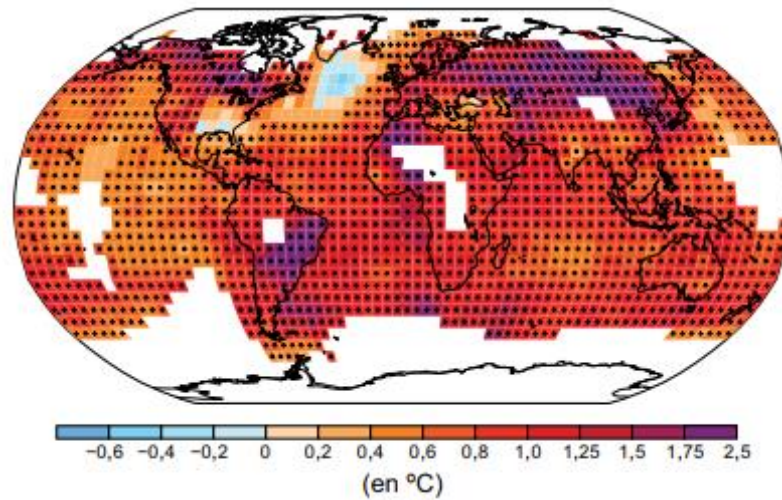


Figure I.1. Carte de l'évolution des températures en surface observée entre 1901 et 2012. Une couleur bleue indique un déficit de température entre ces deux périodes alors qu'une couleur chaude indique une différence positive (extrait du rapport du GIEC, 2013).

Bien que les écosystèmes forestiers soient résilients et historiquement adaptés aux aléas, les futurs CC risquent de se produire à une magnitude et à un rythme qui sont au-delà des capacités d'adaptation naturelle des espèces forestières. Ces CC conduiraient à des pertes importantes dans les services écosystémiques offerts par les forêts avec notamment des réductions dans leurs capacités de puits de carbone (Seppala *et al.*, 2009).

Par conséquent, les probables effets positifs des CC sur les écosystèmes forestiers risquent d'être dépassés par des effets négatifs. De plus, l'impact de l'homme sur le climat ne se résume pas seulement à l'augmentation du CO₂ atmosphérique mais également à une augmentation des concentrations en ozone dans les basses couches atmosphériques, le dépôt de polluants azotés ou encore par l'augmentation des feux de forêts par exemple, ce qui peut aggraver les effets des CC (Bernier et Schone, 2009). Suivant les prédictions des modèles de répartition des espèces, les régions dont les conditions climatiques sont actuellement favorables pourraient devenir inhospitalières pour certaines espèces végétales, et impacter la productivité des forêts voire leur survie (Dupouey, 1992; Badeau *et al.*, 2004 ; Fischlin *et al.*, 2009).

Si les forêts ont des sensibilités différentes aux contraintes avec des capacités de résilience plus ou moins importantes selon les biomes, elles seront néanmoins toutes vulnérables aux CC. Si

la capacité des forêts tropicales à faire face à ces changements est sujet à débat aujourd'hui (Corlett, 2011 ; Huntingford *et al.*, 2013), les forêts tempérées, elles, seront sujettes à des risques importants de dépérissement voire de mortalité.

1.2. Notion de dépérissement: processus mis en jeu.

La notion de « dépérissement » désigne un ensemble de symptômes (au niveau du houppier comme une augmentation de la transparence ou au niveau du tronc comme des suintements, champignons sur les blessures ...) qui pourrait précéder la mortalité (Krause *et al.*, 1986 ; Sinclair et Hudler 1988). Un dépérissement est un phénomène évolutif, caractérisé par plusieurs phases successives et qui peut aboutir à la mort d'un arbre ou, *a contrario*, à sa résilience (la résilience écologique peut être définie comme la capacité d'un écosystème, ici un arbre, une forêt, un écosystème forestier, à retrouver un fonctionnement normal après avoir subi des perturbations importantes).

Les facteurs liés aux dépérissements peuvent être classés en trois catégories : les facteurs prédisposants, déclenchants ou aggravants (Manion, 1981 ; Sinclair et Hudler, 1988). Cependant, un facteur n'est pas exclusif à une catégorie. Par exemple, une sécheresse pourra être classée comme facteur prédisposant, déclenchant ou aggravant suivant qu'elle intervient au début, milieu ou en fin du processus de dépérissement. Aussi, l'impact d'une sécheresse peut être variable en fonction de sa durée, son intensité mais également en fonction du moment où elle intervient durant l'année. En 1981, Manion a représenté ces facteurs sous la forme d'une spirale (**Figure I.2**).

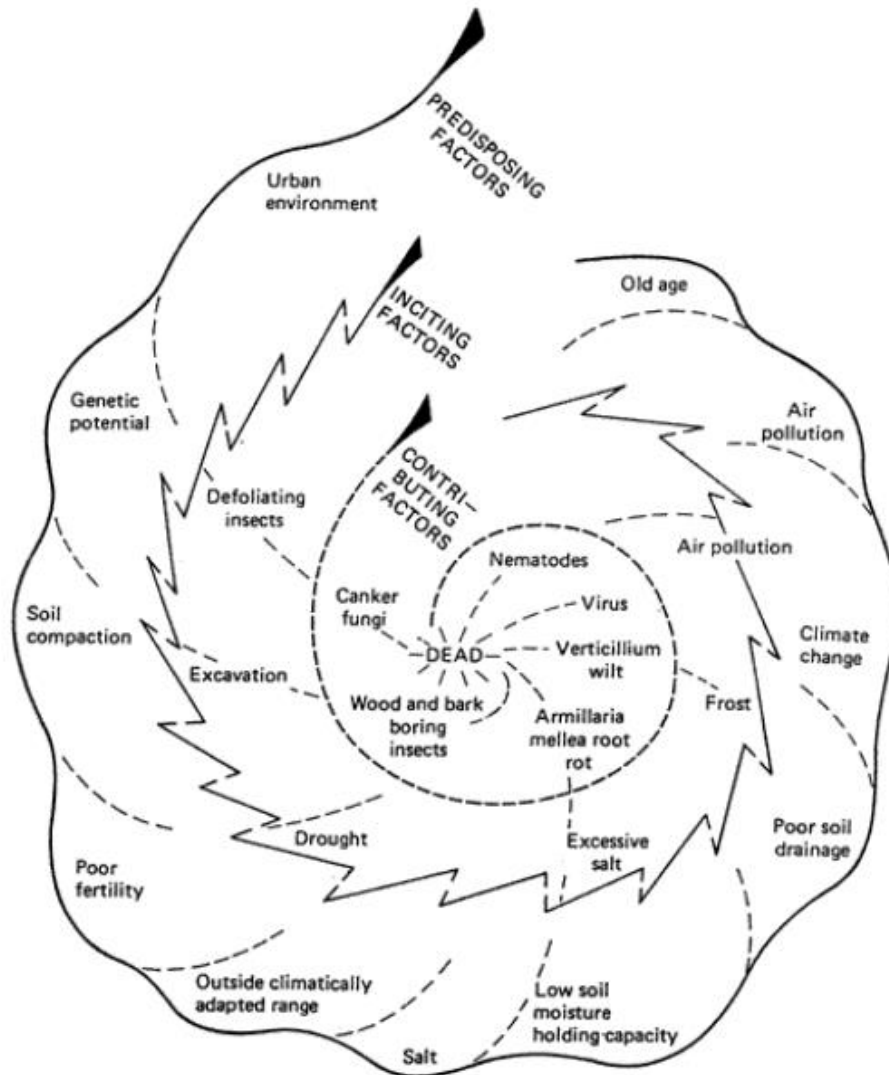


Figure I.2. Figure issue de Manion (1981) illustrant la spirale du dépérissement.

Par exemple, dans les années 60, un important dépérissement a touché les hêtraies en Normandie (Nageleisen, 2010). Deux facteurs ont été associés à la perte de l'état sanitaire des arbres : la cochenille du hêtre et le champignon (*N. fagineta*) responsable de la maladie de l'écorce du hêtre. Cependant, ces facteurs n'expliquaient pas à eux seuls un tel déclin de l'état sanitaire des arbres. Des caractères prédisposant à ce dépérissement ont été identifiés comme le caractère monospécifique du peuplement mais surtout des épisodes de sécheresse prolongée permettant l'installation de cochenilles (Nageleisen, 2010). Ainsi, dans cet exemple, pour que l'installation d'un agent biotique ait un impact considérable sur la santé d'un arbre, il est nécessaire que des facteurs prédisposants (ici les sécheresses et la monospécificité) entrent en action.

Un autre exemple est à noter plus récemment. En 2003, une sécheresse intense a perturbé les hêtraies de Lorraine, en particulier les populations localisées à des endroits où la réserve utile en eau du sol était faible. Ces populations ont montré des signes de dépérissement (pertes foliaires, descentes de cime...) et ont, par la suite, été soumises à une attaque par des parasites de faiblesse (scolytes, agriles, armillaire...). Néanmoins, les hêtraies n'ont présenté que de faibles taux de mortalité indiquant que des caractéristiques propres à l'arbre ont permis cette résistance (Nageleisen, 2010). En effet, malgré des dépérissements dans les années 90 et 2000, le hêtre est l'essence feuillue qui montre un des meilleurs états sanitaires en France (IFN, 2013 ; **Figure I.3**).

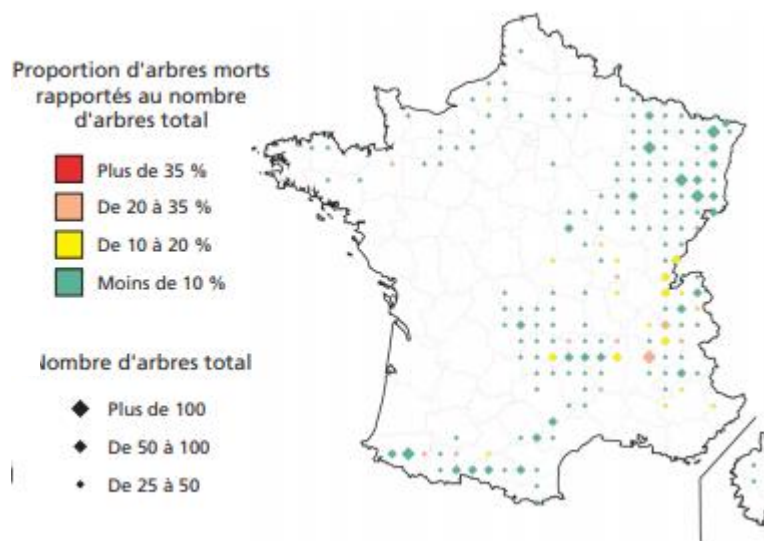


Figure I.3. Proportion d'arbres morts rapportée au nombre total d'arbres recensés lors de campagnes d'inventaires, cas de *F.Sylvatica*. Source : IFN, 2013.

Cependant, via l'augmentation en fréquence et en sévérité des événements extrêmes, les changements d'aires de répartition des espèces et les dynamiques démographiques des ravageurs, les changements climatiques vont jouer un rôle prépondérant dans l'évolution de l'état sanitaire de nos forêts. Malgré la capacité des arbres à pouvoir s'adapter à des contraintes sévères, des épisodes de dépérissement allant jusqu'à la mortalité ont été rapportés dans le monde entier dans la dernière décennie et cette tendance est prédite à l'augmentation avec les futurs changements climatiques globaux (Lloret *et al.*, 2012 ; Anderegg *et al.*, 2013 ; Allen *et al.*, 2015 ; Hartmann, 2015 ; Meir *et al.*, 2015).

1.3. Le hêtre : une espèce décidue menacée

Le hêtre (*Fagus Sylvatica* L.) est une espèce très bien représentée dans les forêts françaises, présentant un volume sur pied de 263 Mm³, ce qui la place seconde espèce feuillue en France derrière le chêne (IFN, 2013). Le hêtre est une espèce d'ombre en milieu mésophile (conditions de température modérée) à sec (Teissier du Cros *et al.*, 1981) qui, pour avoir un développement optimal, a besoin d'une pluviométrie de 600 mm par an, bien répartie dans l'année (Bastien, 2000). La répartition du hêtre en France est située en plaine dans la moitié nord et en montagne dans la moitié sud, jusqu'à 1700 m d'altitude.

D'un point de vue écophysiological, le hêtre présente le paradoxe d'avoir une croissance radiale très sensible au déficit hydrique du sol (Magnani et Borghetti, 1995 ; Backes et Leuschner, 2000 ; Lebourgeois *et al.*, 2005) mais de ne présenter que rarement de la mortalité (0,3% de mortalité annuelle en moyenne en France depuis 20 ans, communication personnelle Louis-Michel Nageleisen, DSF). Cet arbre, appelé aussi fayard, atteint sa limite sud d'aire de répartition en France dans la région PACA. En deçà de cette ligne, le hêtre ne retrouve pas les ressources nécessaires, notamment l'humidité, pour avoir un développement optimal.

Les modèles de distribution des espèces prédisent cependant une large rétractation de son aire de répartition vers le nord d'ici 2100 (Badeau *et al.*, 2010 ; Kramer *et al.*, 2010 ; Cheaib *et al.*, 2012). Les changements climatiques contraignent désormais cette espèce à des choix restreints : l'adaptation, la migration ou la disparition.

Ces modèles de répartition se basent sur une approche pédoclimatique qui intègre des descripteurs climatiques et de sol pour caractériser les évolutions potentielles de niches écologiques des espèces. Pour améliorer ces prédictions, d'autres variables devraient être incluses dans ces modèles. Des facteurs internes à l'arbre telle qu'une capacité à résister à une perturbation par une allocation des ressources carbonées ou azotées modifiée par exemple (Liu *et al.*, 2017). Le maintien de processus physiologiques indispensables pour sa survie comme le transport de solutés, le maintien d'un statut carboné ou azoté suffisant pourrait expliquer pourquoi le hêtre semble résistant face aux contraintes climatiques. En effet, des études récentes ont montré que le hêtre peut être résistant à la sécheresse et présenter de la résilience (Tegel *et al.*, 2014 ; Hentschel *et al.*, 2016). Mais l'impact de changements climatiques de plus grande ampleur risque d'être important sur cette espèce (Simon *et al.*, 2017) entraînant de fortes conséquences sur toute la forêt française et ses dérivés ; particulièrement en Lorraine, région d'étude de ces travaux, première région de récolte de hêtres en France.

1.4. Objectifs de ce travail de thèse

Il est donc nécessaire de créer des expérimentations menant à de la mortalité des arbres afin d'analyser les modifications physiologiques qu'elles impliquent. L'étude de la mort des arbres peut être scindée en plusieurs questions dont celles-ci : (1) pourquoi certaines espèces d'arbres sont résistantes alors que d'autres non et, à une échelle plus individuelle (2) pourquoi un arbre meurt-il plutôt qu'un autre ?

Ces questions sont depuis longtemps posées dans la littérature (Bossel, 1986 ; Franklin *et al.*, 1987 ; Manion, 1981 ; Martínez-Vilalta *et al.*, 2002 ; Bréda *et al.*, 2006) et la réponse ne repose pas uniquement sur des caractéristiques pédologiques ou environnementales mais aussi sur des processus physiologiques internes de l'arbre.

Ainsi, McDowell et son équipe ont proposé en 2008 une approche intégrative de la mort de l'arbre, impliquant plusieurs hypothèses, pouvant répondre de manière exhaustive ou non sur les causes de la mortalité d'un arbre. Depuis, les études traitant de la compréhension des processus menant à la mort des arbres ont été en forte augmentation n'amenant pas encore une compréhension complète de tous les processus mis en jeu.

Les mécanismes engendrant la mortalité sont complexes et aujourd'hui encore mal connus (Choat *et al.*, 2018). Si certaines hypothèses sont avancées pour expliquer pourquoi un arbre meurt et un autre survit, différentes recherches sont nécessaires afin de combler ce manque et, par conséquent, améliorer nos modèles de prédiction afin d'avoir un schéma d'aménagement forestier plus adéquat aux climats futurs.

L'objectif de cette thèse est d'améliorer notre compréhension de la réponse de jeunes hêtres dans un contexte de modification de la disponibilité de ressources carbonées et azotées. Dans ce travail, nous avons donc cherché à mieux comprendre comment les arbres répondent à des contraintes environnementales lorsque ces ressources s'amenuisent.

Nous avons alors étudié l'effet de défoliations annuelles consécutives ou d'une sécheresse édaphique sur les métabolismes carboné et azoté du hêtre. Notre dispositif expérimental a permis d'engendrer de la mortalité et, par conséquent, nous avons pu apporter des informations supplémentaires dans la compréhension des processus menant à la mortalité du hêtre.

La synthèse bibliographique ci-dessous va alors permettre d'argumenter notre choix d'étudier les métabolismes carboné et azoté dans l'arbre face à une contrainte et dans un contexte de

mortalité. Néanmoins, compte tenu de la place centrale du système hydraulique de l'arbre et des fortes interactions avec les métabolismes carboné et azoté, celui-ci sera présenté également.

L'hypothèse d'une mort à la suite d'une défaillance du système hydraulique sera abordée en premier lieu compte tenu de son importance centrale dans la physiologie de l'arbre et pour le maintien de ses fonctions vitales. Les deux autres hypothèses (déficiences carbonées et azotées) sont celles qui font le cœur de cette thèse et seront développées à la suite de l'hypothèse hydraulique.

CHAPITRE 2: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Pourquoi considérer le fonctionnement hydraulique de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte ?

L'arbre puise l'eau dans le sol et la transporte vers les feuilles dans les tissus transporteurs que forme le xylème. L'arbre peut alors transporter cette eau à plus de 100 m de hauteur, ce qui constitue une performance incroyable. La circulation de l'eau dans l'arbre est permise au moyen d'un différentiel de pression entre le système racinaire et les feuilles. L'eau circule dans le xylème sous tension et s'explique par une continuité hydraulique sur toute la plante, des racines jusqu'aux stomates maintenue par des forces de capillarité. Ce gradient de tension entre le compartiment racinaire et les feuilles permet de transporter des quantités d'eau importantes mais cet équilibre est instable car cette tension est inférieure à la pression de vapeur de l'eau (Cruiziat *et al.*, 2002). Lors d'une sécheresse, la tension dans la colonne d'eau augmente. Si la tension dans la colonne d'eau du xylème devient trop importante, il peut s'en résulter une ébullition locale de liquide en raison d'une baisse de pression statique, ce phénomène est appelé « cavitation » (Cruiziat *et al.*, 2002, **Figure II.1**).

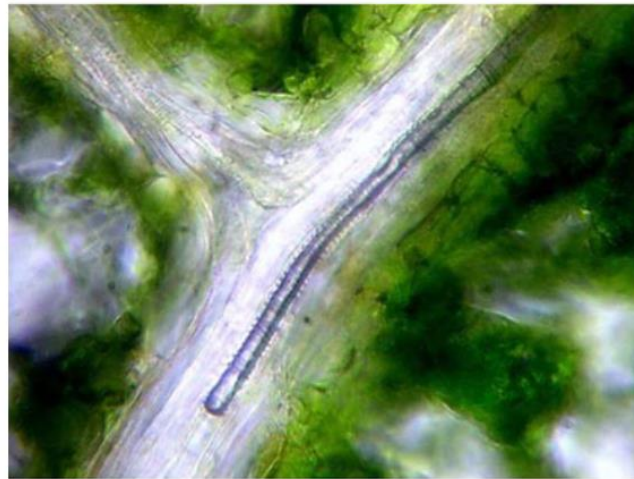


Figure II.1. Photographie d'un phénomène de cavitation dans un vaisseau conducteur.
Source : Cochard and Delzon, 2013.

Lors du phénomène de cavitation, une embolie peut se former, qui coupe partiellement la circulation de liquide des racines vers les feuilles. Aussi, si la proportion d'embolies dans les vaisseaux conducteurs de l'arbre est trop grande, l'arbre se retrouve dans l'impossibilité

d'assurer la transpiration du houppier et par conséquent son hydratation (**Figure II.2**) ; les feuilles risquent alors de se dessécher (Bréda *et al.*, 2006 ; McDowell *et al.*, 2008).

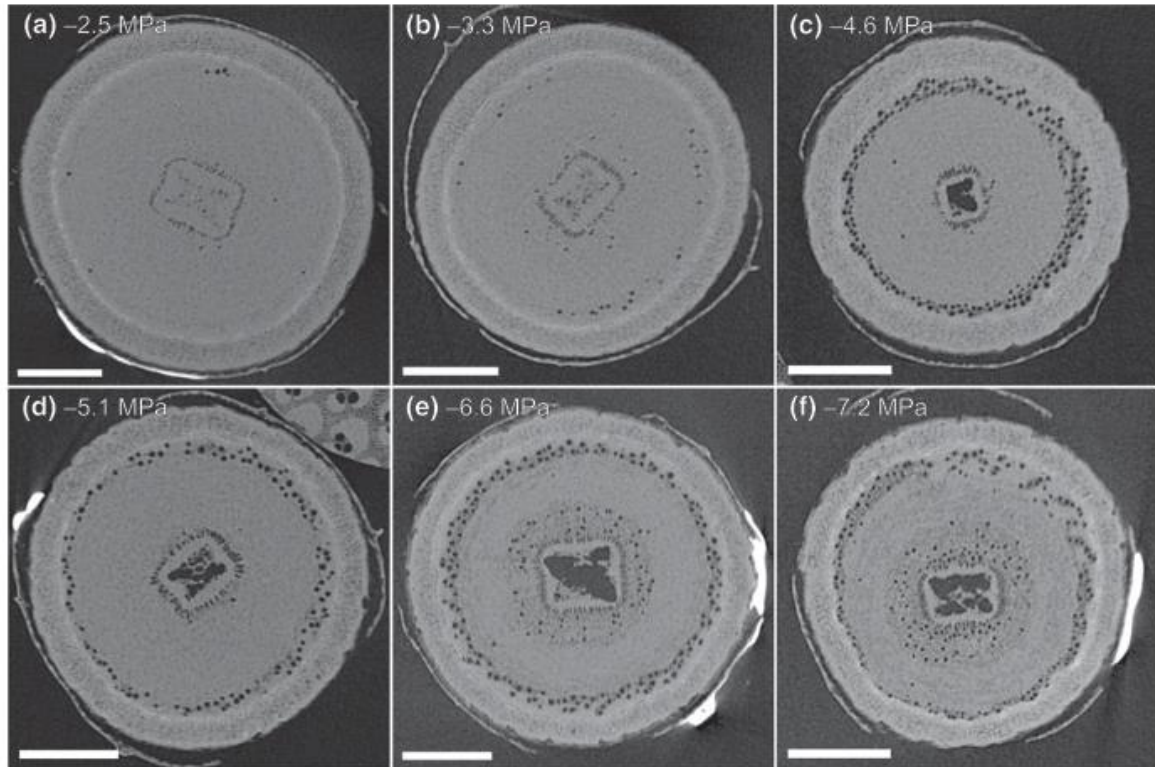


Figure II.2. Scans issus de microtomographie à rayons X de coupes transversales de tronc d'*Eucalyptus camaldulensis* sous différents potentiels hydriques négatifs illustrant la propagation des embolies (cercles noirs) lors d'une sécheresse. Source : Nolf *et al.* (2017).

En modulant l'ouverture stomatique, l'arbre peut mettre en place des stratégies d'évitement de la formation des embolies en diminuant la force de tension dans les conduits. Ceci peut être également obtenu en réduisant sa surface foliaire transpirante (Bréda *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2011 ; Ryan, 2011 ; Sade *et al.*, 2017). Mais lorsque les niveaux de sécheresse dépassent les capacités d'évitement de l'arbre, des dysfonctionnements généralisés du système hydraulique peuvent intervenir et aboutir à la mort. En effet, des études ont montré qu'une relation existe entre le taux de survie aux sécheresses et la résistance du xylème à la cavitation aussi bien sur de jeunes plants (Pratt *et al.*, 2008 ; Brodrigg *et al.*, 2010 ; Barigah *et al.*, 2013, Venturas *et al.*, 2017) que sur des arbres matures (Cochard *et al.*, 2008 ; Urli *et al.*, 2013 ; Nardini *et al.*, 2013). Néanmoins, la réponse hydraulique peut être différente selon les espèces.

En effet, les espèces dites anisohydriques ajustent peu leur conductance stomatique lors d'un événement de sécheresse. Par conséquent, celles-ci présentent des sensibilités plus grandes à la cavitation, le métabolisme carboné étant peu affecté (McDowell *et al.*, 2008). A l'opposé, des espèces dites isohydriques ajustent rapidement leur conductance stomatique lorsqu'elles sont confrontées à un stress hydrique leur conférant une forte résistance à la cavitation mais en contre-partie la production de nouveaux assimilats carbonés est limitée. Le bénéfice d'une stratégie anisohydrique est une assimilation carbonée non interrompue lors d'un épisode de sécheresse modérée alors que les espèces isohydriques auront tendance à être plus rapidement dépendantes des composés carbonés mis en réserve (Mitchell *et al.*, 2013 ; Sevanto and Xu, 2016). Néanmoins, la distinction entre les espèces isohydriques et anisohydriques est sujet à débat aujourd'hui (Garcia-Forner *et al.*, 2015). En effet, la distinction entre les deux stratégies se base sur une observation de la réponse stomatique ou de la dynamique de potentiels hydriques sans tenir compte d'autres facteurs importants que peuvent être la résistance aux embolies (Linton *et al.*, 1998 ; Wilson *et al.*, 2008) ; le maintien de la turgescence des feuilles (Meinzer, 2016) ou encore le maintien du transport phloémien (Nikinmaa *et al.*, 2013 ; Sevanto *et al.*, 2014 ; Dannoura *et al.*, 2018). La théorie hydraulique ne peut donc pas, à elle seule, répondre à cette grande question de savoir comment un arbre meurt. Aussi, il est nécessaire d'avoir une approche plus intégrative pour aborder la réponse des arbres à une sécheresse et dans la prédiction des mécanismes de mortalité. La théorie hydraulique de mort des arbres n'est probablement pas exclusive et d'autres hypothèses ont été avancées.

2.2. Pourquoi considérer le métabolisme carboné de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte ?

2.2.1. La photosynthèse, lieu de production des hydrates de carbone et leur transport

L'arbre fixe le CO₂ atmosphérique via la photosynthèse, un processus qui transforme l'énergie de la lumière solaire en énergie chimique pour produire des hydrates de carbone et autres métabolites organiques. Les hydrates de carbone issus de la photosynthèse peuvent être utilisés :

- i) Soit pour l'élaboration des structures notamment lors de périodes de croissance, on les appelle alors les hydrates de carbone structuraux qui formeront la lignine, la cellulose et les hémicelluloses (constituants des parois primaires et secondaires). Ce carbone fixé ne sera pas remobilisable pour une utilisation ultérieure car les arbres manquent d'enzymes spécialistes pour dégrader ces macromolécules (Hartmann *et al.*, 2016) [*nb: la possibilité de remobiliser l'hémicellulose lors d'épisodes de stress importants est sujet à débat aujourd'hui dans la communauté scientifique (Hoch et al., 2007)*];
- ii) Soit pour alimenter les besoins métaboliques de l'arbre: on les appelle les hydrates de carbone non structuraux (Non-Structural Carbohydrates ou NSC en anglais). Ils sont constitués de sucres simples ou monosaccharides (glucose, fructose, arabinose, xylose, ribose, galactose pour les plus importants), de disaccharides comme le saccharose, et d'amidon (polymère de glucose). Le saccharose représente généralement près de 75% de la fraction des sucres solubles, le glucose et le fructose environ 20% (Kramer et Kozlowski, 1979). Les sucres solubles sont impliqués dans de nombreuses fonctions métaboliques comme composés osmotiques jouant un rôle de protection contre la dessiccation cellulaire en cas de sécheresse par exemple mais aussi comme substrats pour la respiration ou la synthèse de nouvelles molécules. Ils peuvent jouer également un rôle comme composés de défense ou dans le transport des nutriments, de l'eau et du carbone ainsi que dans l'export et les échanges symbiotiques (Delaporte, 2015; Hartmann *et al.*, 2016 ; Preece *et al.*, 2018). De longues chaînes de

monosaccharide peuvent également former de l'amylopectine ou de l'amylose. Ces dernières sont les deux constituants de l'amidon. Contrairement aux sucres simples, l'amidon n'est pas soluble dans l'eau et est osmotiquement inactif permettant son stockage en grande quantité. L'amidon est le principal composé de réserve chez une grande partie des essences forestières notamment *Quercus Petraea* et *Fagus Sylvatica* L. (Sinnott, 1918). Cependant, chez certaines espèces ce sont des formes solubles qui sont majoritaires comme le saccharose chez *Pinus Strobus* L. (Jourdan, 1980), ou le stachyose chez *Fraxinus* (Webb et Burley, 1964).

La journée, l'amidon va être stocké dans les feuilles et sa remobilisation, puis son exportation sous forme de saccharose, va permettre d'apporter les substrats carbonés nécessaires à la croissance et la respiration de nuit (Smith et Stitt, 2007). Les nouveaux produits issus de la photosynthèse (glucose, fructose, saccharose) peuvent être incorporés aux tissus foliaires en quelques minutes mais peuvent aussi pour la plupart être exportés hors des feuilles (sous forme de saccharose) et être utilisés pour différentes fonctions dans l'arbre moins d'un jour après leur assimilation (McLaughlin *et al.*, 1980).

La distance entre la source de production des hydrates de carbone (la feuille) et son puits (zone d'utilisation) peut être très importante dans un arbre adulte. En effet, une partie des sucres produits par la photosynthèse peut être transportée jusqu'aux racines et relâchée dans la rhizosphère dans un processus appelé rhizodéposition (Lynch et Whipps, 1990 ; Delaporte, 2015).

La dynamique du cycle carboné de la feuille (source et exportatrice de carbone) vers les compartiments importateurs (utilisateurs ou puits de carbone) peut varier en fonction de la phénologie (Hoch *et al.*, 2003 ; Epron *et al.*, 2012 ; Mei *et al.*, 2015). Ainsi, les temps de résidence des hydrates de carbone peuvent varier de l'heure ou la journée dans les feuilles et les branches les plus jeunes jusqu'à plusieurs semaines voire années dans le tronc et les racines (Carbone *et al.*, 2007 ; Högberg *et al.*, 2008 ; Warren *et al.*, 2012 ; Desalme *et al.*, 2016). Néanmoins, des facteurs comme la taille de l'arbre, le diamètre de tronc, la viscosité du phloème, la pression de turgescence ainsi que la température peuvent faire varier ces durées (Ruehr *et al.*, 2009 ; Dannoura *et al.*, 2011).

2.2.2. La gestion de ces hydrates de carbone selon un rythme saisonnier

Chez les espèces à feuilles caduques en climat tempéré, les feuilles rentrent en sénescence à l'automne et finissent par tomber laissant l'arbre sans source de carbone d'origine photosynthétique ; l'arbre entre alors en repos hivernal ou dormance. La dormance est un processus du cycle végétatif de l'arbre qui lui permet d'éviter des conditions environnementales défavorables, en l'occurrence l'évitement des températures froides de l'hiver, la baisse de la quantité de lumière disponible par jour et la diminution de la disponibilité en nutriments (Chapin *et al.*, 1990).

Néanmoins, diverses fonctions métaboliques sont encore actives durant cette période, comme la respiration de maintenance. L'arbre devra alors mobiliser et gérer ses ressources internes en carbone afin d'alimenter ses puits de carbone et survivre pendant la période hivernale, mais également pour pouvoir sortir de sa dormance et former un nouveau compartiment foliaire au printemps. Ces feuilles nouvellement formées deviendront alors la principale source de carbone à la saison de végétation suivante. Ce système de gestion des ressources qui permet à l'arbre de survivre durant plusieurs décennies, dont près de la moitié sans feuille, est appelée la fonction de mise en réserve.

Plusieurs définitions de la mise en réserve existent chez les espèces forestières dans la littérature. Ainsi, trois types sont différenciés (Chapin *et al.*, 1990) :

- (1) une accumulation, un excès d'apport par rapport aux besoins de l'arbre pour sa croissance, son entretien et sa reproduction,
- (2) une mise en réserve, qui est régulée et entre en compétition avec d'autres puits de carbone comme la croissance ou la défense
- (3) le recyclage qui correspond à la réutilisation de composés ayant déjà servis et pouvant être utilisés ultérieurement.

Ces trois types de stockage confrontent donc 2 visions antagonistes des processus de stockage avec i) une vision simple de stockage d'un surplus de carbone et donc agissant de manière passive (accumulation) et ii) une vision d'un processus plus complexe, régulé et entrant en compétition avec d'autres puits de carbone (mise en réserve). En effet, Dietze *et al.* (2014) ont défini le caractère actif de la mise en réserve par la sur-régulation de celle-ci aux dépens de la

croissance même sous conditions non contraignantes. La classification de stockage du carbone comme un phénomène actif et/ou passif est sujet à de nombreux débats dans la littérature scientifique (Sala *et al.*, 2012 ; Wiley et Helliker, 2012).

Ainsi, la quantité de NSC présente dans l'arbre fluctue au cours de la saison de végétation. Chez le hêtre, le débourrement et l'expansion foliaire sont connus pour être les puits de carbone les plus forts en début de saison de végétation (Barbaroux et Bréda, 2002) menant à une diminution des quantités de NSC disponibles. Par la suite, la dépendance des feuilles jeunes vis-à-vis du stock de carbone remobilisé diminue avec la mise en place d'un appareil photosynthétique efficient, puis les feuilles matures deviennent autotrophes et source de carbone pour les compartiments puits de l'arbre (Hoch *et al.*, 2003 ; Keel et Schadel, 2010). Pour être transporté des organes sources vers les organes puits, le saccharose est transporté principalement par les tissus conducteurs du phloème (Hollta *et al.*, 2009). Mais d'autres puits de carbone coexistent dans l'arbre. Si les puits de carbone sont forts au début de la saison de végétation (croissance primaire, déploiement des feuilles, croissance secondaire ...), ceux-ci diminuent par la suite (arrêt de croissance secondaire durant l'été). Par conséquent, après avoir atteint un minimum après le débourrement, la quantité de composés de réserve augmente progressivement dans l'arbre pour atteindre un maximum durant l'automne à la fin de la période de sénescence (Nelson et Dickson, 1981 ; Dickson, 1989 ; Barbaroux et Bréda, 2002 ; El Zein, 2011 ; Bazot *et al.*, 2013).

Lors de la sénescence et bien qu'une feuille de hêtre soit composée majoritairement de carbone (environ 45%), celui-ci est immobilisé dans les structures et reste donc dans la feuille (Sade *et al.*, 2017). A la fin du processus de sénescence foliaire en automne les feuilles mortes iront former la litière de l'année qui sera alors décomposée par la biomasse microbienne du sol et enrichira à terme le sol en carbone. Chez les ligneux décidus, le stockage des composés de réserve se fait dans les organes pérennes que sont les branches, le tronc et les racines (Barbaroux *et al.*, 2003 ; Bazot *et al.*, 2016) principalement sous forme d'amidon. Néanmoins, lors des températures basses de l'hiver, en plus de leur fonction comme seule source de substrats carbonés disponibles pour assurer l'entretien des tissus (Chapin *et al.*, 1990), la tolérance au froid des cellules dans les parois nécessite des sucres solubles (Ögren, 2000) qui auront comme conséquence l'abaissement du point de congélation des tissus (Penning de Vries, 1975 ; Sakai et Larcher, 1987 ; Wanner et Junttila, 1999 ; Uemura *et al.*, 2003). Les sucres solubles sont aussi impliqués dans la résorption des embolies hivernales. En effet, par l'hydrolyse de l'amidon contenu dans les parenchymes en sucres solubles, ceux-ci permettent de générer une

pression dans les conduits du xylème qui remplit d'eau les vaisseaux embolisés (Ewers *et al.*, 2001). Les sucres solubles sont donc très importants dans le maintien d'un taux de vaisseaux fonctionnels durant la période hivernale (Améglio et Cruziat, 1992 ; Améglio *et al.*, 2001, 2002, 2004).

Aussi, la quantité de NSC présent dans l'arbre fluctue au cours des saisons, notamment chez les arbres à feuilles caduques en fonction de l'évolution des relations source-puits entre compartiments de l'arbre (**Figure II.3** ; Barbaroux *et al.*, 2003 ; Hoch *et al.*, 2003 ; Spann *et al.*, 2008 ; Schadel *et al.*, 2009 ; Millard et Grelet, 2010 ; El Zein *et al.*, 2011a ; Bazot *et al.*, 2013).

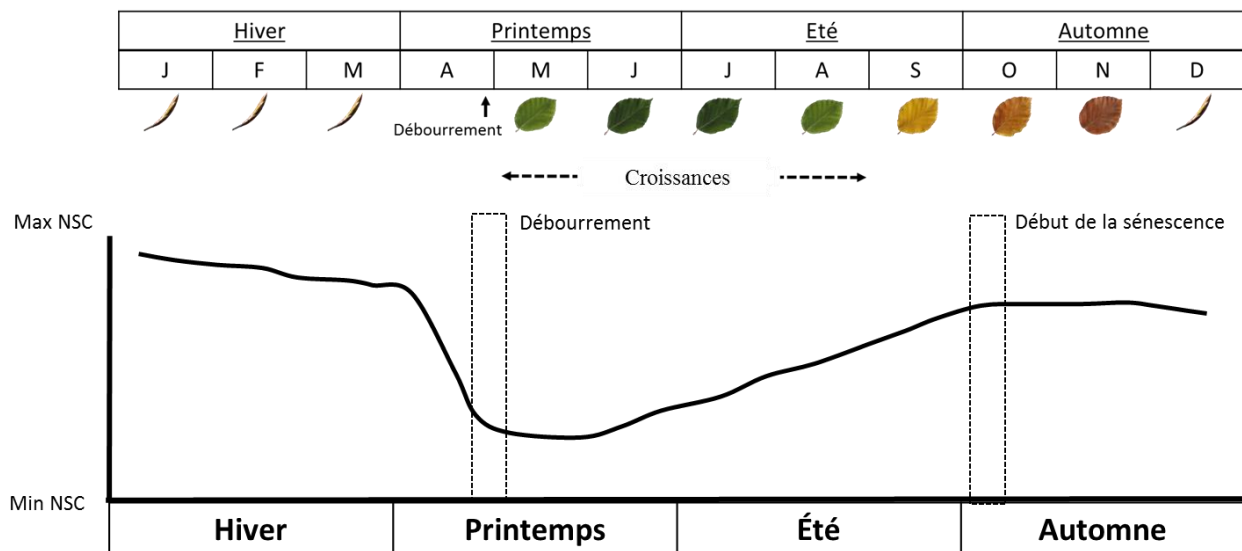


Figure II.3. Schéma représentant l'évolution saisonnière de la mise en réserve carbonée (NSC ; composés carbonés non structuraux). La 1^{ère} phase correspond à la chute de la quantité de NSC mise en réserve lors du débourrement pour répondre à la demande de substrat C au printemps pour la croissance des branches et du compartiment foliaire (Barbaroux *et al.*, 2003 ; Hoch *et al.*, 2003 ; El Zein *et al.*, 2011a ; Bazot *et al.*, 2013 ; Gilson *et al.*, 2014). La seconde phase correspond à l'accumulation de la quantité de NSC dans l'arbre durant la saison de végétation : processus de mise en réserve (Barbaroux *et al.*, 2003 ; Hoch *et al.*, 2003 ; Bazot *et al.*, 2013). A la fin de la troisième phase, la quantité de réserves carbonées dans l'arbre augmente lors de la fin de saison de végétation pour atteindre un maximum en octobre (Barbaroux et Bréda, 2002). La dernière phase se trouve durant la période hivernale où la quantité de réserves carbonées décroît légèrement afin d'alimenter

la maintenance hivernale (Barbaroux et al., 2003; Hoch et al., 2003; El Zein et al., 2011b; Bazot et al., 2013).

2.2.3. Une gestion primordiale lors d'une situation de limitation de production de nouveaux composés carbonés

Malgré ces fluctuations saisonnières, les arbres ne souffrent pas d'un manque de NSC durant la saison de végétation sous des conditions non contraignantes (Barbaroux et Bréda, 2002 ; Hoch *et al.*, 2003 ; Bazot *et al.*, 2013). Si les arbres ne présentent pas de déficit de NSC lors de différentes saisons de végétation sans contraintes, il est possible qu'il n'en soit pas de même lorsqu'un arbre se trouve dans une situation de limitation de la photosynthèse.

Une de ces périodes de limitation peut survenir lors d'un événement de sécheresse. En effet, dans la pléthore de réponses d'un arbre face à un déficit hydrique, la modulation de l'ouverture stomatique joue un rôle central (Cowan, 1982 ; Farquhar et Sharkey, 1982). Afin de réguler cet équilibre entre perte en eau et gain en carbone, les stomates, s'ouvrent et se ferment, engendrant une perte en eau plus ou moins importante par transpiration (**Figure II.4**).

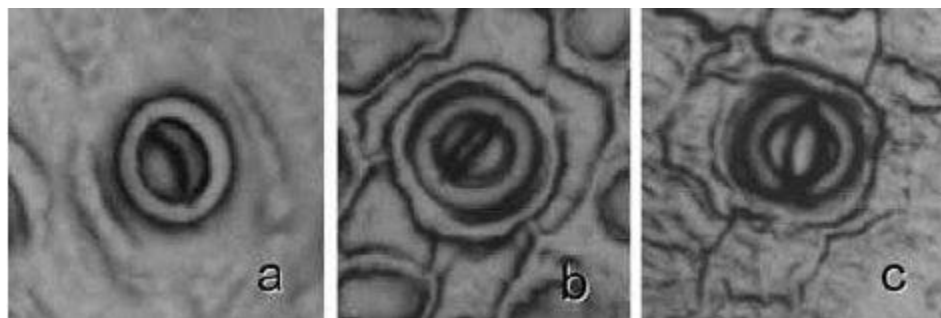


Figure II.4. Photographie d'un stomate majoritairement fermé (a), partiellement ouvert (b) et ouvert (d). Source : Ortega-Loeza et al., 2011.

En modulant les pertes en eau, les arbres peuvent alors éviter une déshydratation de leurs tissus mais, en parallèle, l'assimilation carbonée est impactée.

Aussi, la photosynthèse peut être diminuée par un stress abiotique tel une sécheresse (Bréda *et al.*, 2006 ; Palacio *et al.*, 2008 ; Hartmann *et al.*, 2013 ; Piper et Fajardo, 2014 ; Dickman *et al.*, 2015). La production d'hydrates de carbone est alors impactée mais les puits de carbone dans l'arbre peuvent également être modifiés. Par exemple, la respiration nécessaire pour la maintenance et la croissance peut être augmentée ou diminuée lors d'un événement de

sécheresse (Flexas *et al.*, 2006 ; Atkin et Macherel, 2009; Pinkard *et al.*, 2011; Rowland *et al.*, 2015). La respiration augmente également avec la température atmosphérique et par conséquent, les besoins carbonés peuvent augmenter en cas de stress combinés de manque d'eau et d'augmentation de la température menant à une possible consommation des composés de réserve carbonée (Adams *et al.*, 2009).

Certains besoins en composés carbonés dans l'arbre peuvent être diminués lors de sécheresse. Chez le hêtre notamment, la croissance radiale peut être fortement diminuée lorsque l'humidité du sol baisse (van der Werf *et al.*, 2007; Michelot *et al.*, 2012). De plus, le compartiment foliaire peut être aussi impacté par une sécheresse via une diminution de la surface foliaire totale notamment avec des feuilles de taille réduite (Bréda *et al.*, 2006). D'autres ajustements métaboliques sont également possibles impactant de manière plus ou moins importante la dynamique des réserves carbonées (Delaporte, 2015).

La complexité de ces réponses peut être accrue si l'on considère différentes formes d'hydrates de carbone (amidon, sucres solubles). Si l'amidon a pour seul rôle connu celui de la mise en réserve, la contribution des sucres solubles à d'autres métabolismes tels que l'osmorégulation (**Tableau II.1**) ou l'intégrité hydraulique fait que ceux-ci peuvent présenter des dynamiques différentes en fonction du sucre considéré (Dietze *et al.*, 2014 ; Sevanto *et al.*, 2014 ; Hartmann *et al.*, 2016).

Tableau II.1. Classes, exemples et rôles fonctionnels de carbohydrates dans les plantes. Librement adapté et traduit de Hartmann *et al.*, 2016.

<i>Classe de sucres</i>	<i>Exemple</i>	<i>Rôle fonctionnel</i>
Monosaccharides	Pentose Arabinose, xylose, ribose	Métabolisme et osmolytes
	Hexoses Glucose, fructose, galactose	
Di et oligosaccharides	Saccharose, raffinose, stachyose	Transport
Polysaccharides	Hémicellulose, cellulose	Composés structuraux
	Amylose, amylopectine	Composés de réserves

Le transport de solutés dans l'arbre est fondamental pour la survie d'un arbre. Les mouvements de l'eau dans l'arbre sont le produit de gradients de potentiels hydriques et les sucres solubles sont impliqués dans le maintien de la pression de turgescence et l'intégrité du transport longue distance dans le xylème et le phloème (Liu *et al.*, 2008 ; Aranjuelo *et al.*, 2011, Sala *et al.*, 2012). Un possible rôle prépondérant des sucres solubles a été évoqué dans la résorption des embolies (Salleo *et al.*, 1996 ; Brodersen *et al.*, 2010) mais celle-ci est depuis remise en question (Cochard et Delzon, 2013 ; Delzon et Cochard, 2014 ; Choat *et al.*, 2018). Dans le maintien du transport des solutés dans l'arbre, la formation de nouveaux tissus conducteurs a également été mise en exergue dans la lutte contre les embolies irréversibles (Améglio *et al.*, 2002 ; Brodrigg *et al.*, 2010).

La possibilité de remobiliser des NSC mis en réserve dans l'arbre est donc primordiale pour sa survie au cours des saisons mais ceux-ci pourraient être amenés à s'épuiser ou à être dans l'incapacité à être remobilisés des organes sources vers les organes puits, c'est pourquoi la compréhension des mécanismes de stockage et de remobilisation des hydrates de carbone non structuraux est nécessaire lors d'études portant sur les dysfonctionnements et la mortalité des arbres forestiers.

2.3. Pourquoi considérer le métabolisme azoté de l'arbre dans l'étude des mécanismes physiologiques internes face à une contrainte

2.3.1. L'azote, un composé indispensable à la physiologie de l'arbre mais une disponibilité limitée

L'azote (N) est un élément essentiel dans de nombreuses macromolécules incluant les acides nucléiques, qui encodent l'information génétique pour la production des acides aminés constituants de base des protéines, qui assurent de nombreuses fonctions de la vie de l'arbre tout comme dans sa structure.

L'azote joue un rôle fondamental dans le développement d'un arbre bien qu'il ne représente que 1 à 3 % de la matière sèche végétale. En effet, la fertilisation azotée stimule les taux de photosynthèse et la surface foliaire d'une grande partie des arbres alors qu'une faible disponibilité en azote provoque les effets inverses (Hyvönen *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2013).

Bien que sa disponibilité soit cruciale dans le fonctionnement d'un arbre, l'azote est un des éléments les plus limitants pour leur croissance. Si l'air est composé d'azote à 78%, une majorité d'essences forestières est incapable de l'utiliser. Ils sont donc dépendants de la disponibilité en azote du sol, c'est-à-dire de la matière organique et sa décomposition. Cependant, la disponibilité en azote d'un sol forestier limite souvent la croissance des arbres et leur développement (Rennenberg *et al.*, 2006). De nombreux organismes procaryotes sont capables de fixer l'azote de l'air. Aussi, de nombreuses espèces d'arbres ont mis en place des symbioses avec ces procaryotes leur apportant des bénéfices réciproques : les arbres les alimentent en sucres en échange d'azote organique sous forme d'acides aminés. Cependant, il faut noter que certaines espèces d'arbres (robinier, aulne) sont capables de fixer l'azote atmosphérique et peuvent donc pousser sur des sols très pauvres (Rennenberg *et al.*, 2006).

En plus des symbioses, l'arbre peut également absorber l'azote du sol par ses racines sous forme de nitrate (NO_3^-) ou d'ammonium (NH_4^+). De nombreuses études ont montré des résultats variables quant à la forme préférée d'N du sol assimilé par les plantes (Ashton *et al.*, 2008 ; Harrison *et al.*, 2008), suggérant que les plantes se sont adaptées ou acclimatées à prendre la forme qui présente la plus grande disponibilité dans leur environnement proche. Néanmoins, le nitrate est souvent la forme privilégiée avec des concentrations beaucoup plus importantes que celles de l'ammonium dans les sols (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Après son entrée grâce à des transporteurs membranaires, le nitrate est réduit en nitrite (NO_2^-) puis en ammonium par la nitrate réductase et le nitrite réductase respectivement au niveau racinaire ou foliaire. L'ammonium étant un composé toxique pour l'arbre même à de faible concentration, il ne peut donc pas s'accumuler, il est alors transporté dans les plastides et assimilé en glutamate (Crawford et Forde, 2002). L'ammonium transformé est assimilé en acides aminés via la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) puis via différentes aminotransférases qui vont catalyser la formation d'acides aminés comme l'asparagine synthétase qui va permettre la transformation en glutamate et asparagine (Lam *et al.*, 1996). La glutamine et le glutamate sont les premiers acides aminés synthétisés. Par transamination, l'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés pour former de nouveaux acides aminés (aspartate, alanine, glycine, ...).

Une fois réduit et assimilé sous la forme d'acides aminés, l'azote est transporté à longue distance via la sève du xylème, les ions étant entraînés par le flux de sève dont le moteur est la transpiration. Par conséquent, ce transport ne peut donc être effectué que durant la saison de végétation chez les espèces décidues lorsque le compartiment foliaire est présent. Ce transport

est optimal lors de situations climatiques non contraignantes. De plus, l'azote joue un rôle crucial dans le compartiment foliaire où il se retrouve majoritairement dans la machinerie photosynthétique sous forme d'enzymes, notamment la Rubisco ou sous forme de pigments comme les chlorophylles (Millard *et al.*, 2007).

2.3.2. La gestion de la ressource azotée selon un rythme saisonnier

En fin de phase de végétation, les feuilles vont entrer en phase de sénescence, phénomène graduel qui conduit à leur mort cellulaire (Lim *et al.*, 2007). La dégradation de macromolécules et la remobilisation azotée durant la sénescence foliaire permettent à l'arbre de mettre en réserve cet azote foliaire pendant l'hiver pour le réutiliser plus tard (Himmelblau et Amasino, 2001; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Gregersen *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2012 ; Brant *et al.*, 2015). Dans le paragraphe précédent consacré à l'hypothèse carbonée ont été évoqués les différents processus participant à la mise en réserve. Dans ce cas où de l'azote investi dans le compartiment photosynthétique est dégradé puis remobilisé, on parlera alors de recyclage. Cet azote sera alors recyclé vers les parties pérennes de l'arbre.

La résorption de l'azote (*i.e.* la capacité d'un arbre à résorber l'azote foliaire) peut représenter jusqu'à 65% de l'azote foliaire des arbres décidus (Hai-Yang *et al.*, 2018). Compte tenu que la plupart des forêts ont des sols pauvres en azote, une capacité élevée à recycler cet azote foliaire permettrait aux arbres d'être compétitifs dans des environnements pauvres en azote (Hai-Yang *et al.*, 2018).

Par conséquent, de manière similaire au cycle carboné, les arbres ont la possibilité de mettre en réserve des ressources azotées. Le transport se fait principalement sous forme d'acides aminés, de petits peptides ou d'uréides chez certaines plantes. Par exemple, l'arginine est l'acide aminé présentant le ratio C/N le plus faible, il est donc préférentiellement utilisé pour le transport et la mise en réserve (Llacer, 2006) mais d'autres acides aminés (asparagine, glutamine, citrulline) peuvent être également utilisés pour le transport selon l'espèce considérée (Malagutti *et al.*, 2001). L'arginine constitue une large portion de la quantité d'acides aminés présents dans les protéines de réserve (Vegetative Storage Protein ou VSP) dans les organes pérennes (Canton *et al.*, 2005 ; Canovas *et al.*, 2007 ; Valenzuela Nunez *et al.*, 2011 ; Winter *et al.*, 2015). Ces protéines sont spécialisées dans le stockage de l'azote mais ne représentent qu'une partie des protéines totales (Staswick, 1994). En hiver, les arbres entrent en période de dormance où vont alors s'accumuler les VSP dans les organes pérennes (El Zein, 2011). Ces VSP sont en partie utilisées pour la maintenance hivernale (Wildhagen *et al.*, 2010 ; Bazot *et al.*, 2013), leur

accumulation étant corrélée avec l'acclimatation au froid et l'endurcissement au gel chez *Picea glauca* (Binnie *et al.*, 1994).

Si les VSP ont été bien étudiées chez les espèces fruitières (Kang *et al.*, 1982 ; Titus et Kang, 1982; Tagliavini *et al.*, 1998 ; Malaguti *et al.*, 2001 ; Cheng et Fuchigami, 2002 ; Grassi *et al.*, 2002 ; Guak *et al.*, 2003 ; Jordan *et al.*, 2012) elles le sont beaucoup moins chez les espèces forestières (Stepien *et al.*, 1994 ; Vizoso, 2004 ; Valenzuela Nunez, 2006 ; El Zein, 2011 ; Bazot *et al.*, 2013). Au printemps, l'absorption racinaire n'est pas encore suffisante pour alimenter les différents puits d'azote dans l'arbre notamment la formation des nouvelles feuilles et des nouveaux rameaux (El Zein *et al.*, 2011b). La croissance foliaire est alors dépendante des réserves azotées qui jouent un rôle fondamental pour la reprise en croissance au printemps (El Zein *et al.*, 2011b ; Bazot *et al.*, 2013). Les VSP peuvent alors être hydrolysées et remobilisées (King *et al.*, 1997) via un important influx d'acides aminés dans la sève du xylème (Canas *et al.*, 2016). Le recyclage interne de l'azote et l'utilisation des réserves azotées d'un arbre sont alors fondamentaux pour sa survie au cours des saisons où la disponibilité en azote du sol est faible. De part un recyclage efficient via une résorption azotée, celui-ci peut alors fonctionner en hiver pour assurer la maintenance hivernale de l'arbre (**Figure II.5**).

En plus de la remobilisation des réserves azotées, la reprise de la croissance au printemps est généralement liée avec la capacité de survie d'un arbre (Bigler *et al.*, 2006 ; Gessler *et al.*, 2016). Angélique Gilson (2015) a suggéré que des arbres matures ne sont pas limités en azote dû à une plus grande proportion de biomasse des racines moyennes et fines au sein de la biomasse vivante de l'arbre et d'un fort taux de mycorhization, qui leur permettraient une absorption suffisante d'azote (Holden *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012). En effet, bien que la biomasse des racines fines ne représente qu'une faible proportion de la biomasse totale d'un arbre, elles jouent un rôle majeur dans le fonctionnement d'un arbre notamment dans l'absorption minérale.

Une diminution de la disponibilité en azote peut avoir des conséquences sur la croissance, l'architecture et la morphologie racinaire (Kiba *et al.*, 2011). La croissance des racines principales et latérales peut être augmentée lorsque la disponibilité en azote est faible (Lopez-Brucio *et al.*, 2003 ; Gruber *et al.*, 2013). Cette modulation de la surface racinaire permettra alors à l'arbre d'explorer plus de volume de sol.

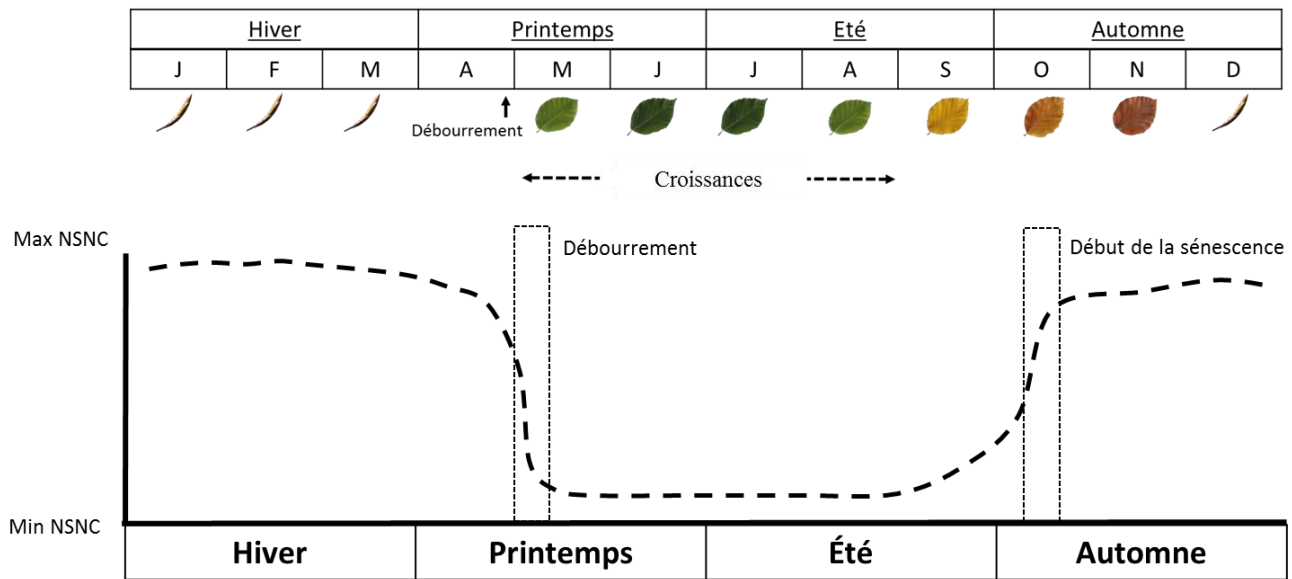


Figure II.5. Schéma représentant l'évolution saisonnière de la mise en réserve azotée (NSNC : composés azotés non structuraux). La 1^{ère} phase correspond à la remobilisation des protéines de réserve lors du débourrement (Gomez et Faurobert, 2002 ; Grassi et al., 2002 ; Millard et Grelet, 2010) et conversion en acides aminés pour la croissance de nouveaux organes avant que l'absorption racinaire soit effective (Gessler et al., 1998 ; El Zein et al., 2011b). La 2^{ème} phase correspond au moment où la source d'azote pour la croissance et le fonctionnement foliaire change en faveur de l'absorption racinaire (El Zein et al., 2011b), la quantité de réserves azotées est à son minimum. La 3^{ème} phase se situe à la fin de la période de croissance, lorsque la quantité de réserves azotées dans l'arbre augmente faiblement jusqu'à la sénescence, c'est le début de la mise en réserve azotée (Staswick, 1994; Stepien et al., 1994). La 4^{ème} phase débute durant la sénescence, l'azote contenu dans la feuille est recyclé (l'appareil photosynthétique est dégradé) et cet azote (sous forme d'acides aminés est alors transporté vers les parties pérennes de l'arbre et stocké sous forme de protéines de réserve (Sauter et al., 1989; Gessler et al., 2004). Enfin, la 5^{ème} phase correspond à la remobilisation azotée via la résorption foliaire qui se finit au cours de l'hiver. Durant cette phase, les acides aminés sont progressivement convertis en protéines de réserve (Staswick, 1994; Stepien et al., 1994; Gomez et Faurobert, 2002; Cooke et Weih, 2005; Valenzuela Nunez et al., 2011; Bazot et al., 2013; Gilson et al., 2014).

2.3.3. Une gestion azotée primordiale lorsque la ressource devient limitante

En cas de déshydratation du sol, la mobilité des ions du sol peut faire défaut comme les déplacements de la faune du sol (Rennenberg *et al.*, 2006). Les arbres poussant dans des environnements xériques ont généralement un ratio racinaire : aérien en augmentation et des systèmes racinaires plus profonds comparés aux plantes poussant dans des environnements mésiques (Schenk et Jackson, 2005) indiquant que la prospection racinaire peut être plus importante quand un sol est sec. Néanmoins, lorsque la disponibilité en eau dans le sol devient très faible, le développement racinaire peut être ralenti voire stoppé (Araya *et al.*, 2015). Cela peut être dû à une contrainte mécanique lorsque la racine rencontre un obstacle, en l'occurrence un sol sec. Une augmentation en sévérité et en fréquence des sécheresses sous climat futur aura un impact sur les taux d'ammonification et de nitrification et les arbres seront sujets à de plus longues périodes de baisse de disponibilité en azote (Rennenberg *et al.*, 2006). Par conséquent, si la disponibilité de l'azote devient plus faible et que la croissance racinaire est ralentie ou stoppée, l'arbre ne pourrait pas être aussi compétitif que la faune du sol. En effet, la compétition face à la ressource azotée du hêtre par rapport à des essences à croissance rapide ou des espèces herbacées est corrélée à l'humidité du sol (Fotelli *et al.*, 2001, 2002, 2004). Aussi, en situation de sécheresse où la disponibilité en azote est plus faible, le hêtre ne pourrait plus être compétitif et présenter des diminutions de croissance (Simon *et al.*, 2017).

Malgré leur importance, peu d'études ont évalué l'impact des perturbations sur le cycle azoté interne chez les espèces ligneuses (Delaporte, 2015). Quelques études ont montré que la nutrition et le cycle azoté étaient impactés par les sécheresses (Rennenberg *et al.*, 2006, 2009; Nahm *et al.*, 2007; Dannenmann *et al.*, 2016; Gessler *et al.*, 2016) mais l'effet de stress sur le fonctionnement azoté des arbres reste encore mal connu. Or, la sensibilité de certaines essences forestières, notamment le hêtre, à des limitations de disponibilité en azote a été confirmée récemment (Simon *et al.*, 2017). Il est donc nécessaire d'inclure le métabolisme azoté interne à l'arbre lorsqu'on cherche à comprendre les mécanismes sous-jacents aux phénomènes de mortalité. La **figure II.6** ci-dessous regroupe les grandes fonctions des cycles carboné et azoté.

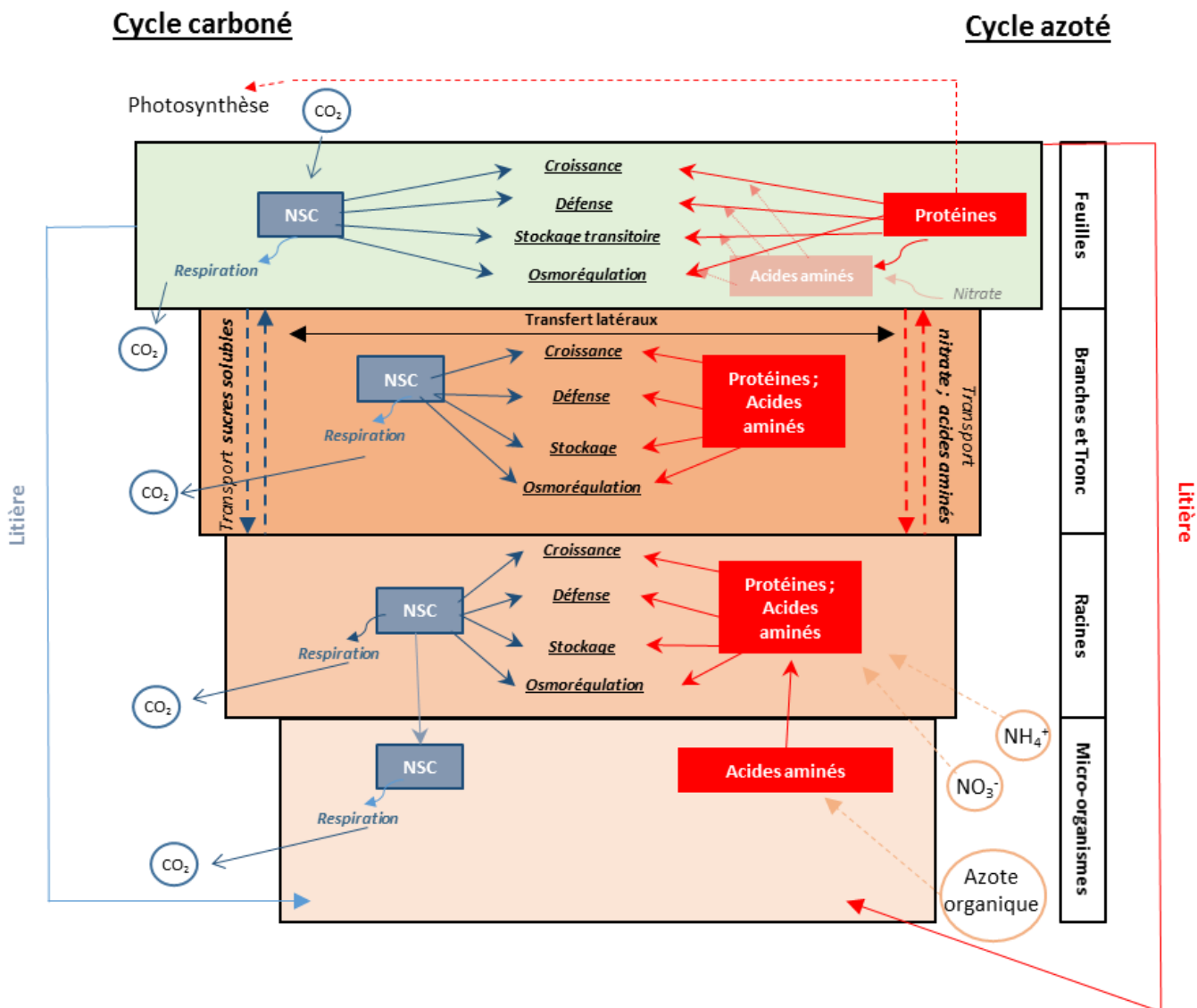


Figure II.6. Schéma représentatif des grandes fonctions des cycles carboné et azoté de l'arbre adapté librement de la thèse d'Angélique Gilson (2015).

2.4. Comment améliorer notre compréhension des processus menant à un phénomène de mortalité ?

2.4.1. Le choix du dispositif expérimental est primordial

L'étude la mortalité forestière a des implications dans de nombreuses thématiques allant de la physiologie moléculaire à la modélisation en passant par des recherches en stratégie de gestion forestière. En fonction de l'approche considérée, les méthodologies appliquées dans la compréhension et la prise en compte de la mortalité sont nombreuses. Cependant, les études de mortalité en conditions naturelles sont rares (*e.g.* Cailleret *et al.*, 2014) dues à l'impossibilité de prédire quand un arbre va mourir. C'est pourquoi les expérimentations contrôlées peuvent être plus utiles car elles permettent de générer des stress contrôlés plus importants, plus longs et laissent aussi le choix du moment dans la saison où le stress est appliqué. Ces conditions contrôlées peuvent être appliquées en phytotron ou en serre mais cela implique que les plantes poussent en pots. La culture en pot a comme conséquence la création de contraintes artificielles de sol entraînant par exemple une limitation du développement racinaire ou une faune du sol différente et quelquefois, des effets liés à la transplantation (Kawaletz *et al.*, 2014 ; Bussotti *et al.*, 2018).

Les expérimentations contrôlées en pot sont surtout adaptées aux arbres au stade juvénile et les résultats obtenus sont difficilement extrapolables à des stades plus âgés (Thomas *et al.*, 2002 ; Baber *et al.*, 2014 ; Hartmann *et al.*, 2018). Par exemple, Hélène Genet (2009) a montré sur une chrono-séquence de hêtre que l'allocation de carbone vers le stockage augmente avec l'âge au détriment de la croissance ; des résultats similaires ont été trouvés par Gilson *et al.*, (2014) sur une chrono-séquence de chêne. Ce facteur âge pourrait donc limiter notre compréhension du fonctionnement des écosystèmes forestiers sous contraintes et notre capacité à prédire la réponse d'arbres matures en forêt exposés à un climat changeant. A un stade juvénile, il apparaîtrait que les arbres privilégient plus leur croissance afin d'éviter un effet de compétition, ce qui s'amenuise sur des arbres au stade mature avec des structures racinaires et aériennes établies. De plus, la croissance d'un jeune arbre peut se faire tout au long de la saison de végétation (Kozlowski et Pallardy, 1997) alors qu'un arbre plus mature aura une croissance seulement une partie de la saison de végétation. En se basant seulement sur ce postulat, les allocations carbonées seront alors différentes en fonction de l'âge de l'arbre. Des arbres très jeunes ne peuvent pas être vus comme des petits arbres matures et la maturation de ceux-ci

engendre forcément des différences de schéma d'allocation des ressources. Par exemple, la proportion des feuilles par rapport à la biomasse de l'arbre diminue avec l'âge (Poorter *et al.*, 2012) ayant une conséquence directe sur l'allocation carbonée et azotée dans l'arbre. Les composés azotés et carbonés étant indispensables dans la physiologie de l'arbre, ceux-ci seront amenés à être transportés de la source (assimilation/absorption ou réserves) vers les organes puits et l'âge aura une importance quant à la distance de transport. Aussi, la localisation des réserves amenées à être remobilisées pourra être modifiée remettant alors en question les résultats trouvés sur des arbres très jeunes et de petite taille. Enfin le plus important reste que nos résultats aient une signification plus ou moins lointaine avec ce qui se passera dans les décennies à venir dans nos forêts. Or, celles-ci ne sont pas équiennes et des arbres de différents stades d'âge seront donc confrontés aux changements du climat. Par conséquent, il est nécessaire de considérer plusieurs stades de maturité d'un arbre.

2.4.2. Le choix de l'espèce d'étude

Compte tenu de la réponse différente face à un stress que peut avoir un arbre à feuilles caduques ou un arbre à feuilles persistantes, un arbre à stratégie isohydrique ou anisohydrique ou encore un arbre à croissance rapide (peuplier, eucalyptus) d'une essence à croissance lente, il est nécessaire d'étudier l'ensemble des espèces d'arbres d'intérêt économique ou écologique qui pourraient présenter des sensibilités différentes face aux futurs changements climatiques. En effet, pour aider les gestionnaires forestiers à mieux préparer les forêts aux aléas climatiques de demain, la variabilité inter-spécifique de réponse des arbres à la sécheresse est actuellement largement étudiée à la fois pour identifier les espèces les plus vulnérables et les plus résistantes (Manion, 1981; McDowell *et al.*, 2008; Voltas *et al.*, 2013; Gessler *et al.*, 2016; Martin-StPaul *et al.*, 2017) mais aussi pour comprendre le fonctionnement des forêts mélangées par rapport aux forêts monospécifiques (Verheyen, 2013 ; Verheyen *et al.*, 2016). De plus, une meilleure connaissance du comportement de certaines espèces face à une perturbation est fondamentale pour simuler précisément la mortalité dans les modèles de dynamique forestière (Meir *et al.*, 2015) surtout dans des régions forestières où l'espèce considérée est d'une importance écologique et économique.

2.4.3. Quelles contraintes à appliquer pour engendrer de la mortalité ?

Les arbres sont des organismes capables de vivre plusieurs centaines d'années (quelques exemples, le Jomon Sugi au Japon dont l'âge est estimé entre 2000 et 7000 ans, Le Sénateur, cèdre de 58m de haut et âgés de 3500 ans malheureusement brûlé en 2012). Les arbres de nos forêts françaises vivent plusieurs décennies ou siècles et sont donc sujets à des contraintes biotiques et abiotiques récurrentes. Afin d'étudier la mortalité d'un arbre, il faut pouvoir modifier son environnement de façon à engendrer des changements tels, que l'arbre ne pourra pas répondre et finira par ne plus pouvoir s'adapter. Dans ce paragraphe seront listées les deux contraintes artificielles appliquées au sein de ce travail de thèse afin d'engendrer de la mortalité.

a. Impacts d'une sécheresse édaphique intense et prolongée

Une sécheresse édaphique aura une incidence selon trois facteurs établis : son intensité, sa durée et le moment où elle intervient (Bréda *et al.*, 2006 ; Ruffault *et al.*, 2013 ; D'Orangeville *et al.*, 2018). Différentes intensités de sécheresse induisent des processus physiologiques différents (Hsiao, 1973 ; Ditmarova *et al.*, 2010). Par exemple, un arbre sous une sécheresse modérée peut ne pas présenter de rupture de la colonne d'eau mais plutôt mourir d'un épuisement de réserves carbonées ou azotées si la sécheresse dure plus longtemps (McDowell, 2011). L'absence de preuves notables d'une mort due à un épuisement des NSC pourraient provenir du fait qu'une majorité d'études prend en compte la dynamique des NSC sur un temps assez court et donc dans le cas où l'arbre fait face à des stress intenses mais de courte durée (Anderegg et Anderegg, 2013 ; Regier *et al.*, 2010 ; Piper *et al.*, 2016). L'importance des interactions entre les cycles carboné et azoté de l'arbre va également dépendre de la durée et l'intensité de la sécheresse. En effet, l'allocation carbonée vers le compartiment racinaire peut être réduite, par manque d'apport en nouveaux assimilats d'origine foliaire, engendrant une absorption racinaire moindre ; une sécheresse intense va retarder l'allocation de carbone vers le compartiment souterrain dû à de probables difficultés de transport alors qu'une sécheresse modérée peut stimuler le transport des photo-assimilats vers les racines et pourrait augmenter la rhizodéposition qui fournit du substrat carboné aux communautés microbiennes du sol en échange de nutriments notamment de l'azote (Lynch et Whipps, 1990 ; Cai *et al.*, 2010 ; Delaporte, 2015 ; Schiebold *et al.*, 2017 ; Preece *et al.*, 2018).

b. Impacts de défoliations intenses et répétées

Naturellement, les arbres peuvent subir des défoliations à la suite d'une gelée tardive, de sécheresse intense, du vent ou résultant d'agents biotiques comme les insectes défoliateurs ou les herbivores. Une défoliation peut grandement réduire la productivité d'un écosystème (Li *et al.*, 2007 ; Clark *et al.*, 2010 ; Vargas *et al.*, 2010) et induire de la mortalité comme après une attaque massive de spongieuse aux Etats-Unis (Davidson *et al.*, 1999) ou par la processionnaire du pin (Palacio *et al.*, 2012). Bien que la réponse de l'arbre à une défoliation ait fait l'objet de nombreuses études, la compréhension des mécanismes internes suite à une défoliation reste à ce jour sous étudiée (Agrawal, 2005).

En effet, la défoliation cause des réponses physiologiques variées affectant plusieurs fonctions métaboliques. Il apparaît que la réponse de l'arbre à la défoliation dépend surtout : (1) des caractéristiques de la défoliation et particulièrement de sa période, de son intensité et de sa récurrence (Piene et Little, 1990 ; Kolb *et al.*, 1999). Dans une étude récente, Jacquet (2012) a montré un effet significatif de la défoliation sur la perte de croissance allant de 25% de perte de croissance pour une défoliation d'intensité faible (0-24%) à 75% pour les plus fortes défoliations (75-100%) sur la croissance du pin maritime. Mais la réponse de l'arbre dépend aussi (2) des caractéristiques de l'arbre hôte et des facteurs environnementaux (disponibilité des nutriments dans le sol, température, disponibilité en eau ...).

Les NSC mis en réserve ont été évoqués comme ayant un potentiel rôle de « tampon » lors d'une défoliation fournissant des substrats carbonés maintenant la croissance malgré la perte de tissus photosynthétiques comme chez *Eucalyptus globulus* (Eyles *et al.*, 2009). Néanmoins, ce maintien de la croissance après une défoliation n'est pas toujours observé. Certaines études ont montré que la croissance décroît suivant la défoliation sans impacter les concentrations de NSC (Reichenbacher *et al.*, 1996; Kosola *et al.*, 2001; Palacio *et al.*, 2008, 2012; Susiluoto *et al.*, 2010; Piper, 2015).

Une défoliation effectuée peu après la mise en place du compartiment foliaire aura comme première incidence de laisser l'arbre avec une surface photosynthétique très réduite pendant une grande partie de la saison de végétation notamment quand le gain en carbone est normalement au maximum (Schäfer *et al.*, 2010).

De plus, l'impact d'une défoliation n'atteint pas seulement le métabolisme carboné de l'arbre mais également son métabolisme azoté. En effet, lors de la période végétative, les feuilles sont le compartiment le plus riche en azote compte tenu des besoins pour la photosynthèse (Kramer

et Kozlowski, 1979). Lors d'une étude sur du hêtre mature, El Zein (2011) a montré qu'en Juin, à la fin de l'expansion foliaire, le compartiment foliaire contenait 38% de l'azote non structural total de l'arbre. Aussi, une défoliation aurait comme conséquence une perte massive et définitive d'une partie importante du stock en azote de l'arbre qu'il ne pourra pas recycler au moment de la sénescence.

**CHAPITRE 3: CONSTRUCTION DE CE TRAVAIL
DE THESE**

L'objectif de ce travail de thèse est d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents au phénomène de mortalité en étudiant l'impact d'une défoliation ou d'une sécheresse édaphique sur les métabolismes carboné et azoté de hêtres (*Fagus sylvatica* L.) initialement âgés de 8 ans. La mortalité étant un processus qui peut subvenir après un temps long, notamment en cas de mort due à un manque de ressources carbonées ou azotées, nous avons mis en place les traitements (sécheresses édaphiques ou défoliation annuelle) pendant 30 mois. Les résultats seront structurés en 4 parties, chacune des parties étant constituée d'un article, soumis ou en préparation.

- **Article n°1 : Dynamique saisonnière des carbohydrates non-structuraux chez de jeunes rameaux de *Fagus Sylvatica* L. âgés de 8 ans suivant une sécheresse ou une défoliation durant 30 mois**

Les rameaux sont les organes proches des parties en croissance de l'arbre qui stockent et remobilisent des réserves plus intensément que les organes plus éloignés (Titus et Kang, 1982) amenant à des dynamiques saisonnières plus marquées (Hoch *et al.*, 2003). Chez le hêtre, il semblerait que les branches remobilisent plus de carbone nécessaire pour le débourrement et la croissance printanière que le tronc (Barbaroux, 2002 ; Barbaroux et Bréda, 2002). Un stockage près des organes puits de carbone semble donc être privilégié chez le hêtre réduisant ainsi la distance lors de la remobilisation. Les branches pourraient alors constituer de bons indicateurs dans le suivi de la dynamique carbonée et azotée au rythme saisonnier et nous souhaitons alors le vérifier. Afin d'avoir une indication des conséquences de trois défoliations annuelles consécutives ou d'une sécheresse sur les concentrations et quantités des composés carbonés dans l'arbre, nous faisons l'hypothèse que le choix de se focaliser sur le fonctionnement carboné des rameaux est pertinent.

Pour ce faire, la composition des NSC (amidon et sucres solubles différenciés) des rameaux de l'année et âgés de 1 an d'un sous échantillon d'arbres a été étudiée pendant 30 mois dans ce premier chapitre. Les dates de minimum et maximum théoriques des NSC dans l'arbre ont été retenues pour les campagnes d'échantillonnage amenant à 5 le nombre de campagnes durant la durée de l'expérimentation. Le sous échantillon d'arbres concernés par cette partie est composé d'arbres témoins (non défoliés et bien irrigués), d'arbres soumis à une défoliation répétée, ou d'arbre soumis à une sécheresse édaphique continue et intense. Lorsque de la mortalité d'arbres a été observée, nous avons également échantillonné ces arbres.

L'article présenté est en cours de préparation pour une soumission prochaine à *Annals of Forest Sciences*.

- **Article n°2 : Est-ce que la dynamique azotée à court terme des branches de *Fagus Sylvatica* L. est impactée par une défoliation ou une sécheresse ?**

Le marquage isotopique est un outil intéressant pour le suivi des cycles biochimiques dans les écosystèmes forestiers et plus particulièrement dans l'arbre. En marquant le compartiment foliaire avec de l'urée enrichie en ^{15}N , des acides aminés vont incorporer cet isotope au cours de leur synthèse puis les protéines seront à leur tour marquées au cours de leur propre synthèse. L'urée est fortement concentrée en azote (46%), soluble dans l'eau et non-polaire, facilitant son incorporation dans les feuilles. L'utilisation d'urée marquée peut alors permettre d'étudier le cycle azoté foliaire et de suivre le transport des molécules azotées de la feuille vers d'autres organes sans altérer le statut azoté des feuilles marquées si la quantité apportée est faible et que la concentration en azote marqué est importante. Le cycle azoté foliaire est dépendant de la phénologie. Aussi, de l'urée absorbée en Juin restera en priorité dans la feuille comme montré par Hill-Cottingham et Lloyd en 1975 alors que plus tard dans la saison de végétation, l'urée suivra le recyclage azoté par démantèlement de la machinerie photosynthétique (Shim *et al.*, 1972 ; Dong *et al.*, 2002) et sera donc transportée hors de la feuille vers les organes pérennes.

La feuille est un puits majeur d'azote durant la saison de végétation et son fonctionnement est essentiel dans le maintien des capacités photosynthétiques de l'arbre ou de sa condition hydrique. Une expérimentation de marquage foliaire au ^{15}N a été effectuée au cours de la seconde année de contraintes. Pour suivre le fonctionnement azoté foliaire au cours de la saison de végétation et pour étudier l'impact de deux durées de sécheresse édaphique mais également l'impact d'une défoliation à moyen et court termes, deux marquages ont été faits à deux moments de la saison, au printemps et en été. Le métabolisme azoté foliaire, l'assimilation azotée dans le circuit protéomique et le transport courte et longue distance ont été étudiés.

Cet article est sous presse dans le journal *Tree Physiology*.

- **Article n°3 : Translocation saisonnière de l'azote foliaire de *Fagus Sylvatica* L. et sa tolérance à un stress : une approche utilisant un marquage isotopique**

Le recyclage automnal de l'azote et sa mise en réserve jusqu'à l'hiver est une étape cruciale dans le fonctionnement azoté saisonnier d'un arbre pour sa survie en période non végétative. Celui-ci pourrait être perturbé par des défoliations successives ou des sécheresses édaphiques

prolongées. Afin de tracer la mise en réserve azotée de l'arbre lors de la sénescence foliaire puis la remobilisation de ces réserves lors du débourrement au printemps suivant, nous avons procédé à un marquage de l'ensemble de la couronne au moment de la sénescence en septembre 2015. Des abattages d'arbres ont été effectués 1 mois après marquage, 5 mois après marquage, au moment où la mise en réserve azotée devrait être la plus élevée, puis après la croissance printanière, en juin 2016 pour suivre l'utilisation des réserves azotées. L'abondance en ^{15}N et la quantité d'azote ont été mesurées dans les différents compartiments des arbres (feuilles, rameaux, branches, tronc et racines).

L'article est en cours de préparation pour une soumission dans *Physiologia Plantarum*.

- **Article n°4 : Evaluation de la mortalité face à une sécheresse édaphique sur de jeunes hêtres**

La mort par rupture du transport d'eau dans l'arbre peut être une cause de la mortalité forestière surtout si celle-ci intervient rapidement après la mise en place de la sécheresse. Néanmoins, une mort due à un manque de ressources carbonées peut intervenir plus tardivement après l'installation de la sécheresse (McDowell, 2011 ; Kulac *et al.*, 2012 ; Klein *et al.*, 2014). En réponse à une contrainte, la réponse de chaque organe de l'arbre peut être différente. En mettant en place des abattages d'arbre complets durant l'expérimentation, nous avons pu avoir une estimation des quantités de réserves carbonées restantes dans les parties aériennes des arbres vivants soumis à une sécheresse ou une défoliation mais également dans des arbres morts suite à ces contraintes. Aussi, 18, 24 et 30 mois après la mise en place des traitements, nous avons procédé à des abattages d'arbres où chaque compartiment (branches, tronc, racines principales, racines latérales, racines fines) a été séparé. Les concentrations en NSC totales, amidon et sucres solubles totaux ont été analysées dans tous ces compartiments et les quantités de NSC présents dans les parties aériennes des arbres témoins, défoliés, soumis à différentes intensités de sécheresse édaphique mais également des arbres morts du traitement de sécheresse a été suivi.

L'article présenté a été soumis à *Journal of Experimental Botany*.

CHAPITRE 4: MATERIELS ET METHODES

4.1. Description du site expérimental avant la mise en place des traitements

Le site expérimental est localisé dans la pépinière du centre de recherche INRA-Grand-Est à Champenoux, en Meurthe-et-Moselle (France, 48°75'27" N, 6°34'10"E). Ce dispositif est constitué à 100% de hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Le site est composé de 6 bâches (24 m x 1 m) où les semis de hêtres ont été mis en place en pleine-terre courant 2007 sur 60 cm de nouveau substrat d'origine agricole (**Tableau IV.1**) sous ombrière pendant 2 ans. Puis les jeunes plants ont poussé sous climat lorrain de 2008 à début 2014 (**Figure IV.1**).

Tableau IV.1 Caractéristiques du substrat en 2008 utilisé dans le dispositif en pleine terre. Analyse granulométrique, pH, rapport carbone/azote (C/N) et matière organique de la terre contenue dans les bâches du dispositif de plantation en pépinière. Une analyse est constituée de trois prélèvements par bêche (Da Silva, 2007).

Texture	Pourcentage (%)
Argile	27 ± 0.98
Limon fin	61 ± 1.28
Sable	12 ± 0.66

Paramètre	Valeurs min et max
pH _{eau}	7.52 - 8.0
C/N	8.76 - 10.4
Matière organique	12.1 – 14.9 g.kg ⁻¹



Figure IV.1 Vue du dispositif expérimental en Septembre 2012 (Crédit photos : T.Paul & F.Bonne).

La hauteur et le diamètre des arbres ont été mesurés chaque hiver depuis 2008. La hauteur des arbres a été mesurée depuis le niveau du sol jusqu'à la cicatrice du bourgeon apical au moyen d'une perche télescopique (**Figure IV.2, A**). Le diamètre des arbres a été mesuré au collet à l'aide d'un pied à coulisse électronique (**Figure IV.2, B**). Afin de mesurer les arbres au même endroit d'une année sur l'autre, le collet a été cerclé à l'aide de peinture blanche. Avant la mise en place des traitements (en 2013), la hauteur moyenne et le diamètre moyen des arbres étaient comparable entre les 6 baches. (**Figure IV.3**).

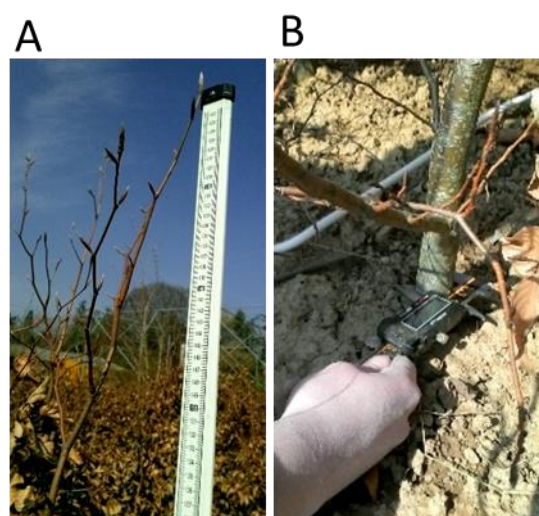


Figure IV.2. Photographies de la mesure en hauteur (A) et en diamètre (B) d'un arbre du dispositif. Crédit photos : C.Massonnet.

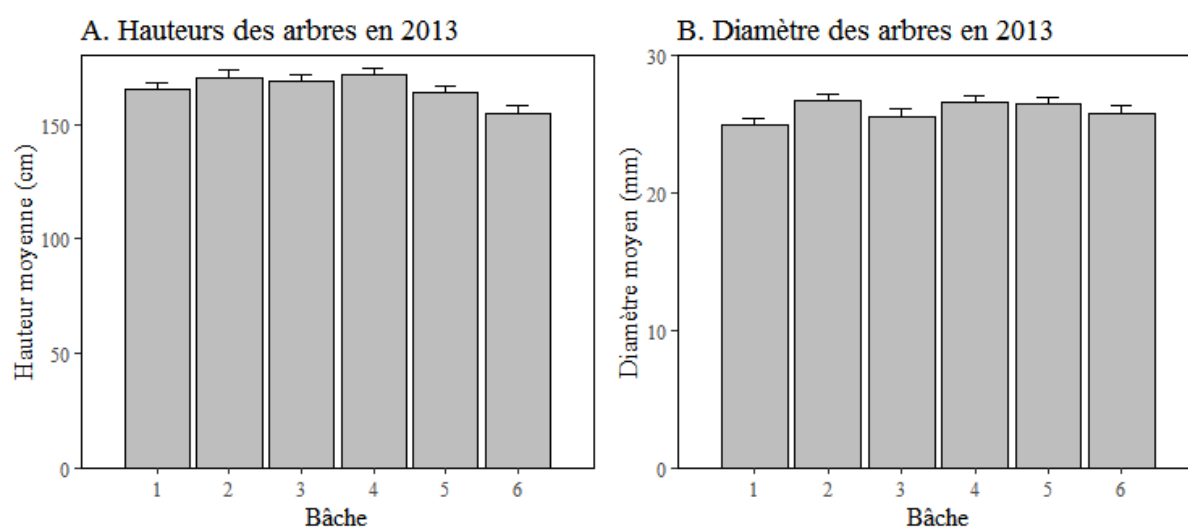
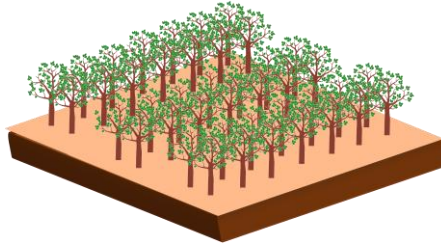


Figure IV.3. Hauteur (A) et diamètre (B) moyen des arbres de chaque bache du dispositif en 2013, avant la mise en place des traitements, moyenne + SE, n=168 par bache.

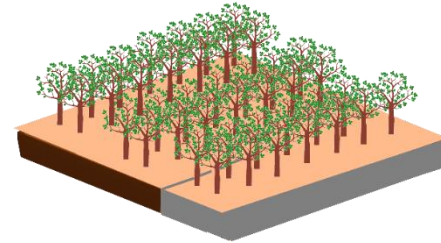
4.2. Mise en place et suivi des traitements

Durant l'hiver 2013-2014, une structure supportant un toit composé de plaques transparentes semi-rigides en polycarbonate a été installée. Les étapes de l'installation de ce système d'exclusion de pluies sont schématisées dans la **figure IV.4** ci-dessous.

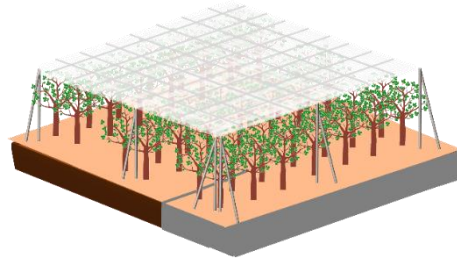
1 1008 *Fagus Sylvatica* poussés sous climat lorrain pendant 8 ans



2 Creusage d'une tranchée autour du traitement sécheresse et pose d'une bâche à 1m80 de profondeur afin d'empêcher les apports latéraux d'eau souterraine et la prospection latérale des racines



3 Pose du système d'exclusion de pluie (avril 2014)



4 Pose de filets latéraux afin d'empêcher les apports latéraux d'eau aériens (mai 2014)

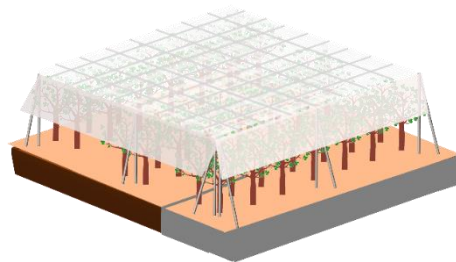


Figure IV.4. Etapes de l'installation du système d'exclusion de pluie. Crédits photos : C. Massonnet et P.A Chuste.

L'aire totale du toit était de 630 m² (30m x 21m). La hauteur sous le toit était de 5 m afin de permettre la croissance en hauteur des arbres durant toute l'expérimentation notamment pour les arbres qui étaient bien irrigués. Tous les arbres ont été placés sous la structure pour un souci d'homogénéisation du microclimat entre les traitements.

Sur les 1008 arbres répartis en 6 baches situées dans le dispositif sous le toit, un tiers des arbres du dispositif (336 arbres) a été sélectionné pour être en sécheresse édaphique correspondant aux arbres situés dans les baches les plus au nord [bâches 1 et 2] (voir **Figure IV.5**). Un second tiers, correspondant aux deux baches centrales [bâches 3 et 4], a été sélectionné pour le traitement de défoliation. Enfin, le dernier tiers [bâches 5 et 6], a constitué le traitement témoin (**Figure IV.5**).

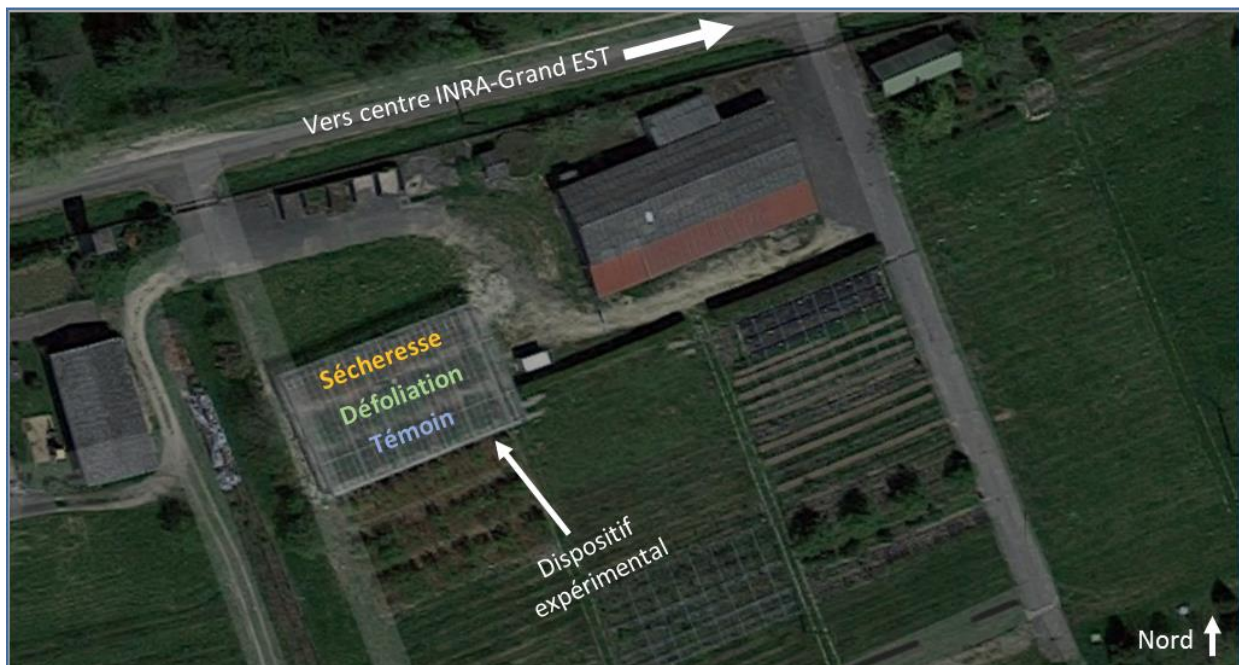


Figure IV.5. Vue satellite du dispositif expérimental avec le toit installé au-dessus de l'ensemble des arbres. Google Maps le 15/03/2017.

4.2.1. Le traitement témoin

Le traitement témoin était constitué de 336 arbres qui ont été bien irrigués à l'aide d'un système de goutte à goutte durant l'ensemble de l'expérimentation. Ils n'ont pas été défeuillés et constitueront donc le point de comparaison par rapport aux arbres sous contraintes présentés ci-dessous.

4.2.2. Le traitement de sécheresse

L'irrigation des arbres des bâches 1 et 2 a été stoppée pendant les 3 saisons de végétation (2014, 2015 et 2016) de l'expérimentation à l'exception d'une légère irrigation (40 mm) qui a été effectuée seulement en fin de saison de végétation en 2014 et 2015.

4.2.3. Le traitement de défoliation

Une défoliation d'une intensité de 75% (**Figures IV.6 et IV.7**) a été effectuée en Juin 2014 et 2015. La défoliation consistait à retirer manuellement 3 feuilles sur 4 réparties dans toute la couronne de l'arbre comme figuré dans la **figure IV.6**. La troisième année, les arbres grandissant et ayant de plus en plus de feuilles chaque année, le traitement a été intensifié en procédant à une défoliation à 90% pour éviter de laisser trop de feuillage sur les arbres. De plus, cette dernière défoliation a été avancée en mai. Chaque année, la défoliation a été réalisée sur les 336 arbres du traitement et s'est déroulée sur environ 2 semaines. Ces arbres ont été irrigués pendant toutes les saisons de végétation.

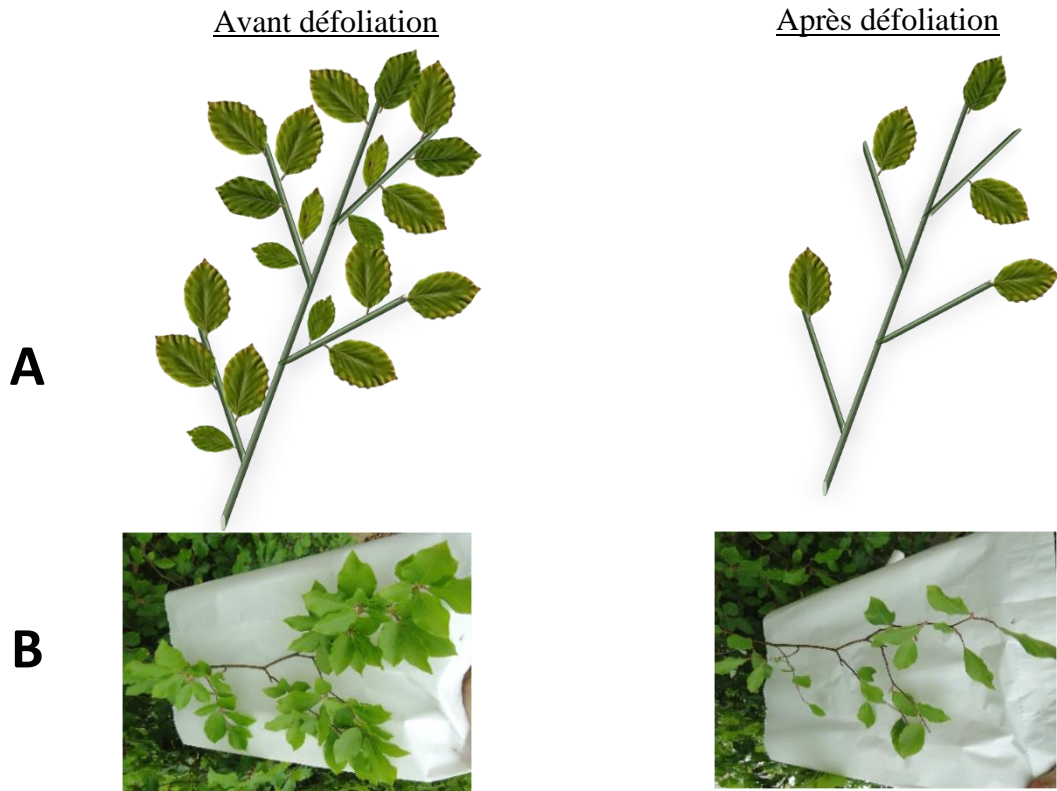


Figure IV.6 Schématisation (A) et photographies (B) d'une branche avant et après une défoliation d'intensité 75%. Crédit photos B : C. Massonnet.



Figure IV.7. Photographie à gauche de deux arbres, l'un défeuillé à 75% à gauche et l'autre non défeuillé à droite. La photographie à droite montre ces deux mêmes arbres défeuillés. Crédit photos : C. Massonnet.

4.2.4. Suivi de l'évolution de l'humidité du sol

La teneur en eau du sol a été suivie à l'aide de sondes à neutron (TROXLER TX 4301, Research Triangle Park, NC, USA). Trois tubes ont été installés dans chaque traitement (témoin, défoliation, sécheresse) deux à une profondeur allant de 0 à 1 m et un à une profondeur de 0 à 1.6 m afin de quantifier la réserve en eau du sol à chaque profondeur (**Figure IV.8**). Durant la saison de végétation, des mesures ont été faites toutes les deux semaines et une fois par mois en hiver.



Figure IV.8. Photographie du dispositif de suivi de teneur en eau du sol. Crédit photo : J. Levillain.

Pour chaque profondeur, la quantité totale de réserve en eau du sol (TAWC en mm) a été calculée en estimant des points caractéristiques à partir des fonctions de pédotransfert pour la mesure de la capacité au champ (θ_{fc}) et la mesure du point de flétrissement (θ_{wp}). La densité du sol a été estimée par la méthode des cylindres. La quantité totale de réserve en eau du sol a été calculée selon Bréda *et al.*, (1995).

$$REW=100* \frac{TAWC-R}{TAWC} \quad (1)$$

Où R le contenu actuel en eau du sol et TAWC le contenu total de l'eau dans le sol.

4.2.5. Caractérisation de l'état hydrique des arbres

Des mesures de potentiel hydrique de base ont été effectuées au cours des trois saisons de végétation 2014, 2015 et 2016 sur un sous échantillon d'arbre répartis dans les 3 traitements (témoin, défoliation, sécheresse). En 2016, des campagnes de mesures ont été réalisées sur l'ensemble des arbres du traitement sec (336 arbres). Elles ont été faites pendant les 2h précédant le lever du soleil. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instruments, Albany, OR, USA). Les pétioles des feuilles étant trop fins pour être correctement installés dans la chambre et garantir une étanchéité, nous avons effectué ces mesures sur des rameaux.

4.2.6. Détermination de la mortalité

Un des objectifs de cette expérimentation était l'étude de la mortalité et seul le traitement de sécheresse a permis d'induire de la mortalité sur nos hêtres. La détermination d'un arbre mort s'est faite par l'observation des symptômes suivants : (1) lorsque l'arbre n'a pas débourré au printemps ou (2) si un assèchement anormal de toutes les feuilles est constaté durant la saison de végétation (**Figure IV.9**).

Ces arbres morts ont été échantillonnés partiellement (rameaux) ou complètement (abattages).

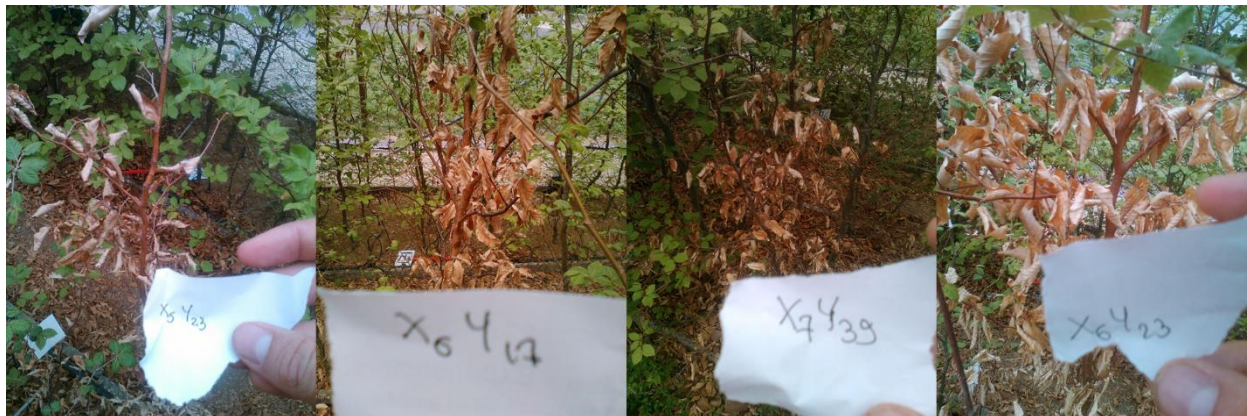


Figure IV.9. Photographies d'une partie des arbres morts durant la saison de végétation 2016. Le code donné sous chaque photo correspond à l'identification unique de chaque arbre. Crédit photo : P.A. Chuste.

4.3. Phase expérimentale de terrain

Afin de suivre les perturbations des cycles carboné et azoté par ces traitements de sécheresse ou défoliation, nous avons mis en place différents suivis :

- Suivi du cycle carboné :
 - Dynamique saisonnière des NSC au niveau raméal
 - Dynamique NSC au niveau arbre entier
- Suivi du cycle azoté :
 - Marquage isotopique ^{15}N du feuillage d'une branche et suivi à court-terme au sein d'une branche
 - Marquage isotopique ^{15}N du feuillage total de l'arbre et suivi saisonnier de l'azote marqué

4.3.1. Dynamique saisonnière des NSC au niveau raméal

Vingt-quatre arbres sélectionnés au hasard ont été suivis pendant toute la durée de l'expérimentation : 8 arbres du traitement témoin, 8 arbres du traitement défeuillé, 8 arbres du traitement sécheresse. Des prélèvements supplémentaires ont également été réalisés sur des arbres morts lorsqu'il y a eu mortalité. Des prélèvements de rameaux ont été effectués sur les arbres des différents traitements chaque année à des dates clés de la saison de végétation pour caractériser la dynamique saisonnière des réserves carbonées : en juin, lorsque les réserves carbonées sont minimales dans les arbres et en octobre, lorsqu'elles sont maximales. L'échantillonnage a eu lieu en octobre 2014, 6 mois après le début des traitements, en juin et octobre 2015, juin et octobre 2016 (**Figure IV.10**).

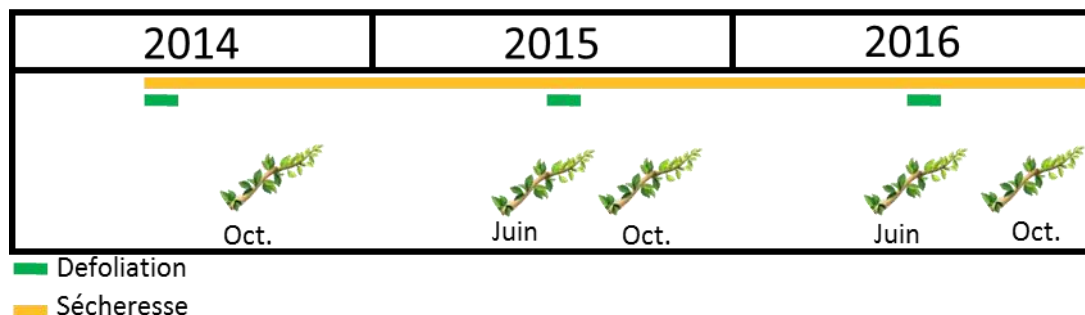


Figure IV.10. Frise chronologique des prélèvements des rameaux pour la dynamique saisonnière des NSC.

Afin d'éviter tout biais dû à une hétérogénéité des rameaux dans l'arbre, 3 branches ont été prélevées par arbre à chaque date d'échantillonnage. Chaque branche prélevée a été divisée selon les années (Y) de croissance et seules les deux dernières (Y et Y-1) ont été gardées.

Au printemps, le rameau de l'année de croissance en cours porte les nouvelles feuilles de l'année et présente une forte remobilisation des ressources carbonées et azotées. La teneur en NSC pouvant être fluctuante suivant l'heure de prélèvement et la date de prélèvement, il a été décidé de ne pas prendre les rameaux de l'année en Juin 2015 et 2016 car ceux-ci étaient tout nouvellement formés et pouvait refléter la physiologie de la feuille qui est dépendante du cycle circadien, et, par conséquent, de l'heure de prélèvement. Une fois prélevés, les échantillons ont été mis dans une pochette papier libellée et immédiatement congelés dans l'azote liquide (-196°C) afin de stopper toute réaction enzymatique. Enfin, les bourgeons dormants ont également été retirés avant les analyses en laboratoire afin de pouvoir faire l'objet d'une autre étude. Les échantillons ont ensuite été stockés dans un ultra congélateur à -80°C.

4.3.2. Dynamique saisonnière des NSC et répartition dans les différents compartiments de l'arbre

Cinquante-huit arbres ont été abattus à différentes dates entre Octobre 2015 et Octobre 2016 (**Figure IV.11**). Les dates sélectionnées ont été les suivantes :

- En Octobre 2015 et Octobre 2016, respectivement 18 et 30 mois après le début des traitements et à la date théorique dans la saison de végétation où la quantité de NSC mise en réserve est maximale.
- En Juin 2016, 24 mois après le début des traitements, à la date théorique dans la saison de végétation où la quantité de NSC en réserve est la moins importante.

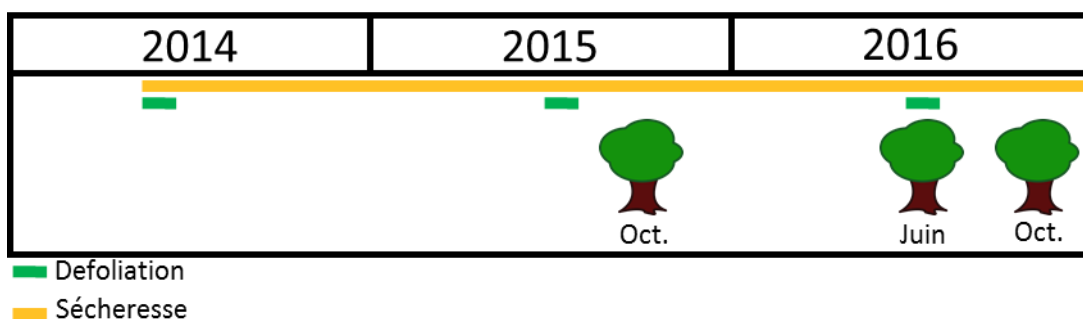


Figure IV.11. Frise chronologique des prélèvements arbres entiers pour la dynamique saisonnière des NSC.

Le tableau ci-dessous (**Tableau IV.2**) donne les effectifs par traitement à chaque date. A noter que l'on a sélectionné des arbres morts uniquement en 2016.

Tableau IV.2. Effectifs des arbres abattus par traitement à chaque date.

Traitement	Octobre 2015	Juin 2016	Octobre 2016
TEMOIN	6	6	4
DEFEUILLE	6	6	4
SECHERESSE	6	6	4
MORT	/	6 (tous secs)	4 (tous secs)

Avant chaque abattage, une description des unités annuelles de croissance du tronc avait été faite. Le protocole d'abattage fut le même à chaque date, avec :

- La coupe de l'arbre sur le terrain au-dessus du collet et transport de l'arbre jusqu'à la salle de découpe (1 minute en voiture).
- Arrivé en salle de découpe, l'arbre a été entièrement défeuillé et le feuillage de l'arbre a été pesé. Parmi ces feuilles, deux aliquotes de feuilles ont été prélevées au hasard :
 - o a) Une aliquote de 100 feuilles a été passée au planimètre afin d'estimer la surface foliaire de ces 100 feuilles puis ces feuilles ont été séchées à l'étuve à 80°C pendant 48h et pesées afin d'obtenir la masse sèche.
 - o b) Une aliquote de 20 feuilles a été prélevée et plongée immédiatement dans l'azote liquide, stockée à -80°C puis lyophilisée pendant 5 jours sous vide et conservée au sec pour des mesures biochimiques ultérieures.
 - o c) Les feuilles restantes ont été séchées à l'étuve à 80°C pendant 48h pour avoir la biomasse totale foliaire de l'arbre et pouvoir calculer la surface foliaire totale de l'arbre par les relations d'allométrie.
- Trois branches réparties uniformément dans l'arbre ont été prélevées et sous-échantillonnées par année de croissance :
 - rameau de l'année (Y)
 - rameau de l'année précédente (Y-1)
 - Le reste de la branche (<Y-1)

- Les branches restantes de l'arbre ont été prélevées et mises à l'étuve à 80°C pendant 48h afin d'obtenir la masse sèche. Les branches mortes, s'il y en avait, ont été pesées à part.
- Le tronc a été divisé en fonction de la hauteur dans l'arbre. Ces différents échantillons de tronc ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.
- Le compartiment racinaire a été excavé une fois la découpe de l'arbre effectuée. L'excavation totale du compartiment racinaire fut impossible compte tenu de la proximité des arbres dans le dispositif et la compacité du sol du traitement sec. Par conséquent, la masse racinaire n'a pas été comptabilisée comme représentant la totalité de celle-ci. A l'exception d'Octobre 2015, les racines ont été séparées selon leur diamètre (d) (racine fines $d < 1\text{mm}$; racines latérales $2\text{mm} < d < 5\text{mm}$; racines principales $d > 5\text{mm}$). Une aliquote de chaque classe racinaire (fine, latérale, principale) a été plongée dans l'azote liquide et conservée à -80°C.

4.3.3. Dynamique a court terme du ^{15}N dans les branches

Le marquage au moyen d'azote enrichi (^{15}N -urée) a été effectué durant la saison de végétation 2015 à deux dates clefs (Figure 25), à la fin du mois de Mai (Day of Year: 148) et à mi-Juillet (Day of Year: 187) (**Figure IV.13**).

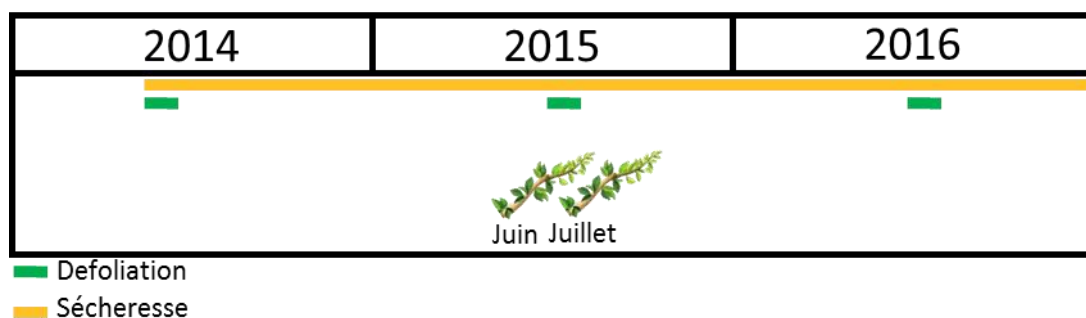


Figure IV.13. Frise chronologique des prélèvements foliaires et bois pour étudier la dynamique à court terme ^{15}N dans la branche.

Le choix de la saison de végétation 2015 pour le marquage a été dicté par la volonté d'estimer si le fonctionnement azoté serait perturbé après une année de contrainte. Un premier marquage

a été fait fin-mai 2015, une fois l'expansion foliaire terminée et avant la défoliation de 2015 et un second marquage a été réalisé en juillet 2015, 3 semaines après la défoliation.

Pour cette expérimentation, nous avons choisi d'avoir deux intensités de sécheresse différentes déterminées suivant les potentiels de base mesurés sur ces arbres : une sécheresse modérée pour les arbres avec des potentiels autour de -0,5 MPa et une sécheresse sévère pour les arbres avec des potentiels autour de -1,2 MPa. Douze arbres par traitement (contrôle, défoliation, sécheresse modérée et sécheresse sévère) ont été sélectionnés. Sur chaque arbre, une branche située à un étage foliaire équivalent (à hauteur de poitrine) a été isolée dans un sac plastique transparent (**Figure IV.14.A**) et une solution aqueuse d'urée enrichie en ^{15}N (ISOTEC Inc $^{15}\text{N}_1$ 10,4% ^{15}N , concentration 5 g/L) a été pulvérisée sur les feuilles au moyen d'un vaporisateur (**Figure IV.14.B**). Suite au marquage, le sac en plastique a été fermé autour de la branche marquée, bien ficelé à la base de la branche et percé de trous afin d'éviter une trop grande condensation. Le marquage a été effectué en fin d'après-midi (16-18h).

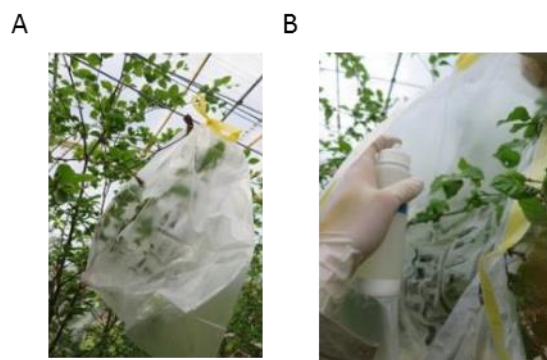


Figure IV.14. Photographies de l'expérimentation de marquage sur une branche. A : Mise en place d'un sac en plastique autour de la branche à marquer afin d'éviter toute contamination environnante. B : Pulvérisation de l'azote marqué sur les feuilles au moyen d'un pulvérisateur.

Le sac plastique a été maintenu toute la nuit afin d'éviter toute contamination du sol et des branches voisines et a été enlevé le lendemain matin (8h) suivant le marquage. Le protocole d'échantillonnage fut le suivant et fut le même pour les deux opérations de marquage (Juin / Juillet) :

- A T_0 , avant le marquage, des échantillons foliaires et de rameaux ont été prélevés afin de quantifier le niveau d'abondance naturelle en isotope ^{15}N dans ces 2 compartiments.

- A $T_{0.5}$, soit le lendemain matin du marquage, des feuilles ont été échantillonnées. Nous nous proposons d'échantillonner des feuilles d'une branche durant 14 jours, aussi, il aurait été compliqué d'échantillonner des feuilles complètes tout au long de l'expérience sans être certain que cette défoliation forcée ne change pas le métabolisme azoté. Aussi, nous avons choisi d'échantillonner les feuilles à l'aide d'un poinçonneur (**Figure IV.15.A et IV.15.B**). Cinq disques (aire = 38mm²) de feuilles ont donc été prélevés sur 5 feuilles différentes à $T_{0.5}$.
- A T_1 (1 jour après le marquage) et T_2 (2 jours après le marquage), des échantillons foliaires ont été prélevés de la même manière qu'à $T_{0.5}$. et sur les mêmes 5 feuilles.
- A T_4 (4 jours après le marquage), le reste des 5 feuilles trouées a été prélevé. Une autre feuille a également été prélevée pour quantifier l'assimilation de ¹⁵N dans les protéines foliaires sur un sous échantillon des arbres marqués (6 arbres/traitement/ date).

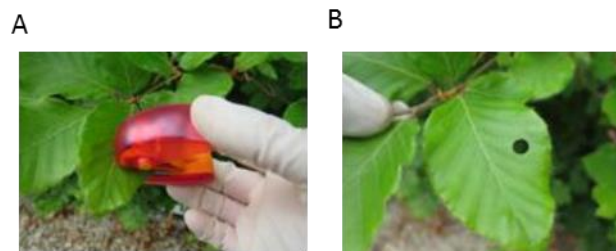


Figure IV.15. Photographies des prélèvements foliaires réalisés suite à l'expérimentation de marquage sur une branche. A : Utilisation du poinçonneur afin de prélever un échantillon foliaire. B : Feuille trouée suite à l'utilisation du poinçonneur.

- A T_7 (une semaine après le marquage), un nouveau prélèvement foliaire par poinçonnage a été effectué sur 5 nouvelles feuilles.
- Enfin, après 14 jours, l'ensemble du feuillage de la branche marquée ainsi que la branche portant les feuilles marquées ont été récoltés. La branche a été séparée par pousse annuelle. Des feuilles provenant du rameau apical de l'arbre ont été également échantillonnées afin de suivre le transport longue distance de l'azote.

A chaque date d'échantillonnage, les échantillons ont été soigneusement lavés à l'eau distillée et immédiatement plongés dans l'azote liquide. La **figure IV.16** ci-dessous résume le calendrier de l'expérimentation.

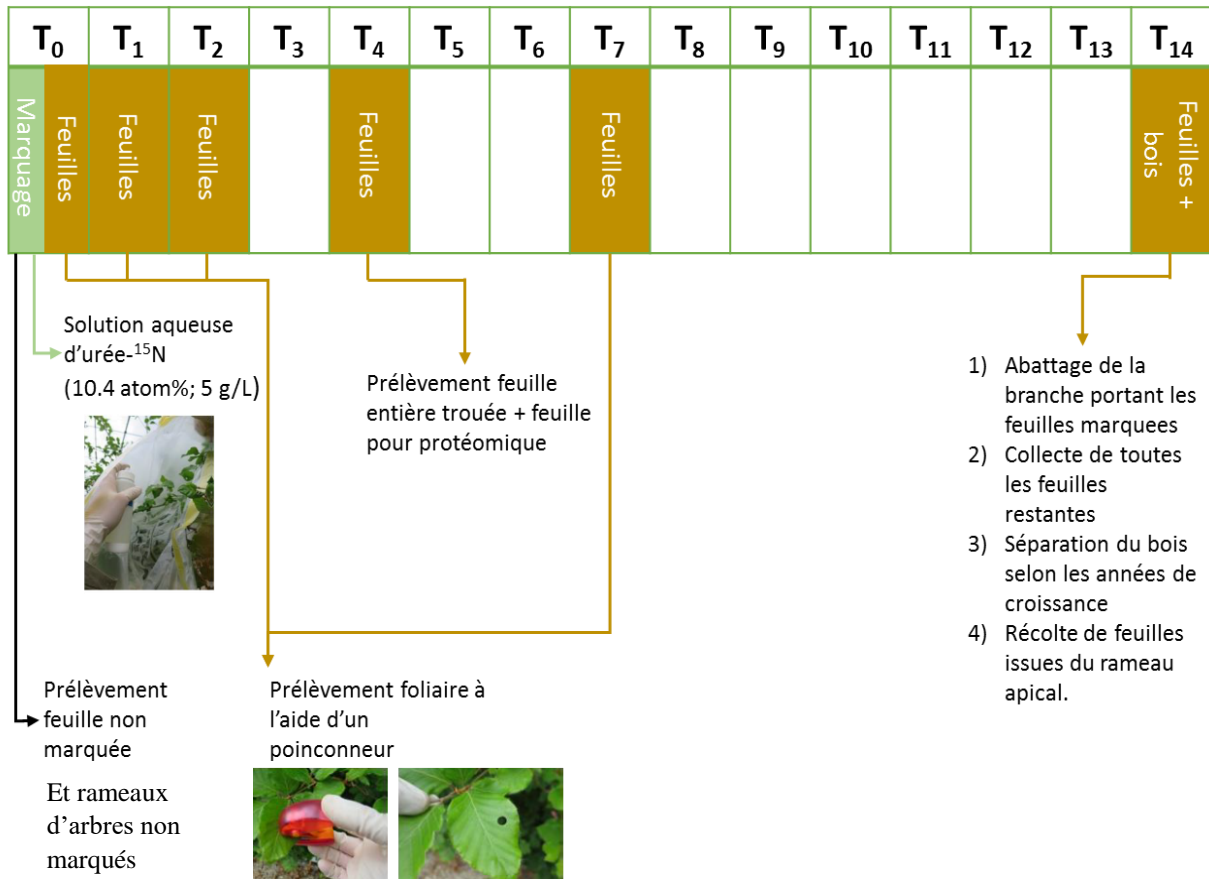


Figure IV.16. Schéma récapitulatif de la stratégie expérimentale de notre marquage à l'azote 15.

4.3.4. Allocation du ¹⁵N à l'échelle arbre entier

De manière analogue au marquage ¹⁵N branche, nous avons distingué pour cette expérimentation deux niveaux de sécheresse selon les valeurs de potentiels de base mesurées en Septembre 2015 au moment du marquage. Ainsi, 2 classes d'arbres ont été choisies dans les traitements secs en fonction de leur potentiel hydrique de base, de -0,5 à -1,5 MPa, classés en tant que secs modérés et une seconde classe avec des potentiels de base compris entre -2,5 MPa et -4 MPa classés en tant que secs sévères.

Une solution aqueuse d'urée enrichie en ^{15}N (urée- $^{15}\text{N}_2$, 10,4 atom% (5 g/L)) a été appliquée sur le feuillage au moyen d'un pulvérisateur (**Figure IV.17.A**). Afin d'éviter toute contamination du sol et des arbres avoisinants suite au marquage, des sacs plastiques transparents ont été installés sur toute la couronne et attachés au collet de l'arbre. L'ensemble des feuilles a reçu, sur la face inférieure et supérieure, de l'urée marquée en partant des étages foliaires inférieurs et en remontant au fur et à mesure jusqu'à la cime de l'arbre. Le sac transparent a ensuite été fermé à son extrémité (**Figure IV.17.B et C**) et afin d'éviter toute condensation à l'intérieur dû à la transpiration foliaire, le sac a été troué à plusieurs endroits. Le sac transparent a été enlevé le lendemain matin en début de matinée.



Figure IV.17. Photographies de l'expérimentation de marquage ^{15}N -arbre entier. A : pulvérisation de l'urée marquée sur les feuilles. B et C : Sac en plastique transparent mis en place après le marquage, percé de trous et enlevé le matin suivant le marquage.

Suite à ce marquage, trois séries d'abattages ont eu lieu :

- en Octobre 2015, un mois après le marquage, au moment théorique du recyclage de l'azote foliaire vers les parties pérennes de l'arbre, afin de déterminer si notre marquage foliaire et la résorption foliaire étaient effectifs.
- en Février 2016, 5 mois après le marquage pour suivre la remobilisation théorique de l'azote des feuilles vers les organes puits que sont les organes pérennes de l'arbre (branches, tronc, racines).
- en Juin 2016, 9 mois après le marquage, une fois l'expansion foliaire terminée lorsque la remobilisation des réserves azotées vers les organes puits que sont principalement les feuilles à cette date est achevée (**Figure IV.18**).

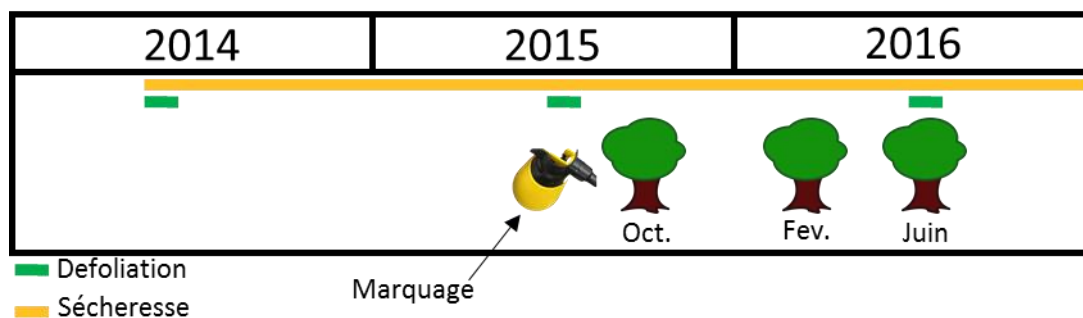


Figure IV.18. Frise chronologique des abattages pour la répartition ^{15}N arbre entier.

Les effectifs des abattages sont donnés ci-dessous (**Tableau IV.3**).

Tableau IV.3. Tableau des effectifs des arbres abattus pour suivre la répartition ^{15}N arbre entier.

	Octobre 2015	Février 2016	Juin 2016
C	2	6	6
D	2	6	6
MD	2	3	3
SD	2	3	3

Les compartiments sélectionnés pour l'analyse isotopique sont :

- L'ensemble du feuillage en Février (constitué par la litière récoltée au moyen d'un filet) et du feuillage de l'année en Juin.
- L'ensemble des branches.
- Le tronc selon la hauteur (base, à mi-hauteur, au sommet).
- Le compartiment racinaire découpé selon le diamètre de manière analogue à la partie NSC arbre entier.

Afin d'éviter toute contamination isotopique entre échantillons lors de l'abattage, chaque instrument utilisé a été soigneusement lavé entre chaque découpe.

Des arbres supplémentaires non marqués ($n=10$, arbres communs avec ceux utilisés pour l'analyse de la répartition des NSC à l'échelle arbre entier) ont été également abattus pour déterminer l'abondance naturelle en ^{15}N des différents organes de l'arbre.

4.4. Phase de préparation des échantillons pour les analyses

Tous les échantillons congelés dans l'azote liquide ont été lyophilisés (déshydratation à froid par sublimation de la glace sous vide) sur une période de 5 jours. (Dura-Top, Dura-dry, FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA) puis ont été ensuite stockés au sec à l'abri de la lumière. Enfin, ils ont été mis à l'étuve à 45°C pendant 48h avant d'être pesés afin d'avoir la matière sèche (MS, mg) de chaque échantillon. A noter que les échantillons enrichis isotopiquement et ceux non marqués ont été traités indépendamment (lyophilisés, pesés, broyés et stockés séparément) afin d'éviter toute contamination des échantillons non marqués.

Les échantillons ont été broyés à l'aide d'un broyeur à bille ou à anneaux (**Figure IV.19**) selon le volume (CEPI SODEMI CB2200, Cergy, France). Une fois broyés, les échantillons ont été stockés en pilulier ou en eppendorf à l'abri de la lumière. Une étape supplémentaire de lavage à l'éthanol du matériel de broyage (bol, bille, spatule) a été effectuée sur les échantillons enrichis afin d'éviter toutes contamination entre les échantillons.

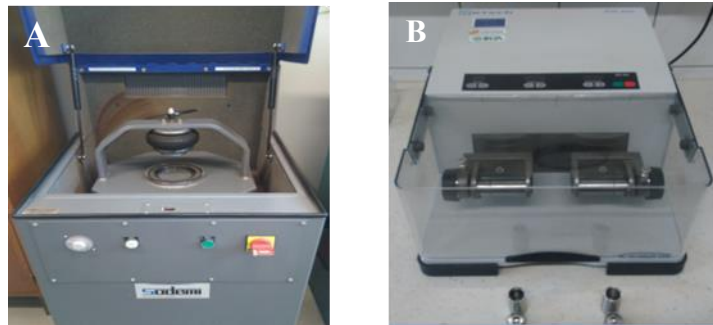


Figure IV.19. Photographie du broyeur à anneau (A) et à billes (B). Crédit photo : L. Yahiaoui.

4.5. Phase expérimentale de laboratoire

4.5.1. Dynamique saisonnière des NSC au niveau raméal

a. Choix de la méthode d'extraction des sucres solubles

Préalablement séchés 24h à 45°C, 10 mg ($\pm 0,5$) de matière sèche ont été prélevés pour les analyses biochimiques. Selon la littérature, différentes méthodes d'extraction des sucres solubles sont utilisées dont 3 principales: l'extraction à froid au méthanol 70%, l'extraction à chaud à l'éthanol 80% ou l'extraction à froid à l'aide d'un mélange ternaire méthanol, chloroforme, eau. Ces différents protocoles sont disponibles en Annexe n°1 de ce manuscrit. En termes de praticité, l'extraction à l'éthanol est celle qui est la moins contraignante car n'utilisant pas de produits hautement toxiques et volatils nécessitant une hotte, comme le méthanol ou le chloroforme. Néanmoins, nous avons fait des tests préliminaires pour comparer les résultats issus de ces trois méthodes d'extraction. Nous avons choisi un sous échantillon représentatif des différentes dates de prélèvement sur le terrain (mai et octobre) mais également des différents organes considérés (rameau de l'année et rameau de l'année précédente). Les résultats ont montré que, sur nos échantillons, la méthode d'extraction ne montre pas de résultats différents en termes de sucres simples (sucres solubles) ou de sucres complexes (amidon) (voir **Annexe 3**). De plus, un article publié en 2015 par l'équipe d'Audrey Quentin comparant les différentes méthodes d'analyses des NSC préconise l'extraction à l'éthanol à 80°C. Cette méthode est donc celle qui a été retenue pour l'analyse fine des sucres simples et complexes de cette expérimentation.

b. Extraction à l'éthanol 80% à chaud

Une aliquote (10mg $\pm 0,5$) de poudre lyophilisée a été placée dans un premier tube et mise en incubation avec 1 mL d'éthanol à 80% à 80°C durant 30 mn après agitation. Une centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes est nécessaire afin de séparer les deux phases, le surnageant contenant les sucres solubles et le culot contenant l'amidon.

Un pipetage a été effectué afin de récupérer la fraction supérieure, soluble et l'introduire dans un second tube eppendorf. Ces étapes ont été renouvelées 3 fois afin d'extraire un maximum de sucres solubles. Les 3 surnageants ont été réunis. Une autre équipe interne à notre unité de recherche avait fait des recherches au préalable et avait déterminé les étapes d'extraction nécessaires entre 2 et 3 pour garantir un épuisement du culot en sucres solubles sur des

échantillons de rameaux de hêtre (comm. pers.: B. Gérard et S. Lieger). Une fois l'extraction terminée, le tube avec le culot épuisé en sucres solubles mais contenant de l'amidon a été stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

Le tube contenant les trois surnageants de sucres solubles a été placé dans un système d'évaporation à froid sous vide (Maxi dry plus), pendant 14 heures afin d'évaporer l'éthanol et récupérer l'extrait sec de sucres solubles.

c. Quantification des sucres solubles

Les extraits secs de sucres solubles ont été remis en solution dans 1 mL d'eau ultra pure, placés dans un bain à ultrason glacé pour une durée de 1 à plusieurs heures selon le temps nécessaire pour que la solubilisation soit complète. Les tubes ont été agités toutes les 20 minutes dans le bain à ultrasons et la glace changée toutes les 30 minutes. Les tubes solubilisés ont ensuite été filtrés puis analysés par chromatographie liquide ionique (Thermo/Dionex) afin de quantifier la composition précise en sucres simples de notre matériel végétal. Ces analyses ont été réalisées au sein de la plateforme Silvatech (UMR Silva, Inra, Nancy). Les résultats sont donnés en g/100g de matière sèche (MS).

d. Quantification de l'amidon

La méthode de quantification de l'amidon repose sur trois étapes : la solubilisation, l'hydrolyse enzymatique et le dosage.

Solubilisation

La première étape consiste à placer le tube contenant le culot épuisé en composés solubles dans le système d'évaporation sous vide pendant 15 minutes afin d'assécher le petit volume d'éthanol restant. L'amidon est piégé dans les structures du culot résiduel et l'utilisation de soude (NaOH) 0,02N pendant 30 minutes à 100°C permet la création d'empois et rend l'amidon accessible à l'amyloglucosidase. Le tube est ensuite mis en glace afin de stopper la réaction.

Hydrolyse enzymatique

Le contenu du tube (culot + NaOH) est alors mis en solution avec une enzyme, l'amyloglucosidase, qui va hydrolyser l'amidon en molécules de glucose. La réaction enzymatique a lieu à une température de 50°C pendant 30 minutes.

Dosage de l'amidon

Le glucose libre va produire, en présence d'ATP, du glucose-6-phosphate par l'action d'une enzyme, l'hexokinase. Ensuite, la glucose-6-phosphate deshydrogenase aura pour but de catalyser la réaction transformant le glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate. Cette dernière réaction produit un agent réducteur, le NADPH,H⁺ et c'est sur la relation stœchiométrique entre la quantité de glucose initiale et la quantité de NADPH,H⁺ finale que repose le principe du dosage de l'amidon (Boehringer, 1984).

La quantification se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à bande passante (BECKMAN COULTER DU 640 Spectrophotometer). Le NADPH absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm.

Lors de chaque série de mesures (28 échantillons), un témoin négatif contenant de l'eau ultra pure à la place de l'échantillon végétal était systématiquement mis afin d'avoir la densité optique (DO) du mélange réactionnel. La densité optique (DO) du mélange réactionnel était alors soustraite à la DO du mix mélange réactionnel + échantillon végétal afin d'avoir la DO seule de l'échantillon. Une solution de glucose pure à la concentration de 1 mg/L, constituant un témoin positif pour les réactions enzymatiques a été également utilisé à chaque série de mesure. Enfin, un même échantillon végétal était systématiquement dosé à chaque série de mesure afin d'avoir un échantillon contrôle tout au long des dosages.

Le calcul de la concentration en amidon (g/100g MS équivalents glucose) est le suivant :

$$C \left(\frac{\text{g}}{100\text{g}} \right) = \frac{V_{\text{tot}} * V_{\text{ext}} * PM}{E * L * V_{\text{ech}} * MS * 10} * (DO_2 - DO_1) \quad (2)$$

Avec :

C (g/100g) : Concentration en équivalents glucose

V_{tot} (mL) : Volume réactionnel total

V_{ext} (mL) : Volume de l'extrait total de l'échantillon

PM (g/mole) : Poids moléculaire du glucose (180.156 g/mole)

E (l/mmol*cm) : Coefficient d'absorption du NADPH (6.3 l/mmol*cm)

L (cm) : Longueur du trajet optique

V_{ech} (mL) : Volume d'échantillon dosé

MS (mg) : Masse sèche de l'échantillon

DO1 : DO de la solution avant réaction enzymatique

DO2 : DO de la solution après réaction enzymatique

4.5.2. Dynamique saisonnière des NSC et répartition dans les différents compartiments de l'arbre

Dans cette partie, nous nous sommes concentrés sur les sucres solubles totaux et une méthodologie de dosage colorimétrique a été appliquée. Après extraction à l'éthanol 80% à chaud, les sucres solubles et l'amidon ont été dosés séparément.

a. Dosage colorimétrique des sucres solubles à l'antrone

Le dosage des sucres solubles totaux se base sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide. En présence d'acides forts (H_2SO_4) concentrés et à chaud, les pentoses et les hexoses sont déshydratés pour former du furfural ou l'un de ses dérivés. Ceux-ci se condensent avec l'antrone pour donner des produits colorés qui absorbent à 620 nm (Hansen et Moller, 1975). Les sucres solubles ont été dosés à partir d'une prise d'essai de 100 μ L auxquels ont été ajoutés 1,5 mL d'antrone / H_2SO_4 à 70%. Après 10 minutes de réaction à 100°C, les tubes contenant l'extrait de sucres solubles et l'antrone ont été immédiatement mis dans la glace. Ensuite, 750 μ L d'éthanol à 60% (v/v) ont été ajoutés à la solution. Préalablement à la lecture de l'absorbance, une gamme étalon de glucose où le glucose remplace le matériel végétal a été préparée. L'équation de la droite donnant la relation entre l'absorbance à 620 nm et la concentration de glucose a été déterminée graphiquement.

b. Dosage colorimétrique de l'amidon à l'antrone

Le dosage de l'amidon s'est déroulé en deux étapes. La première partie consiste en l'extraction de l'amidon contenu dans le culot issu de l'extraction à chaud à l'éthanol (voir **Annexe 1**). En effet, l'amidon se trouve piégé dans les structures cellulaires et doit donc faire l'objet d'une extraction puis d'une hydrolyse enzymatique afin de pouvoir mesurer ensuite sa concentration en équivalents glucose. Pour ce faire, les tubes T1 ont d'abord été percés, puis les culots qu'ils contiennent ont été séchés à l'étuve à 50°C pendant 1h, afin d'éliminer les reste d'éthanol et d'eau pouvant encore s'y trouver. Ensuite, la création d'un empois d'amidon a été réalisée en ajoutant 900 μ L de NaOH à 0,02N. Le mélange a été "vortexé" puis porté au bain marie à 100°C pendant 30mn. Il a ensuite été refroidi 3-5mn dans la glace. La détermination de la concentration de l'amidon se fait à travers le dosage des monomères de glucose que renferme

sa longue chaîne de polymère. Pour cela une hydrolyse enzymatique de l'amidon est réalisée en ajoutant dans le précédent mélange 100 µL d'amyloglucosidase (SIGMA-A7420-100 mg) en solution dans du tampon citrate à pH=4,6. Après agitation au vortex, on porte les tubes à 50°C pendant 30mn. Ensuite on a refroidi les tubes à la glace puis on a centrifugé afin de tasser au fond des tubes les structures cellulaires pour récupérer facilement le surnageant qui contient le glucose dérivé de l'hydrolyse de l'amidon. La seconde partie du dosage reprend le principe du dosage des sucres solubles à l'anthrone.

Le calcul de la concentration en sucres solubles ou amidon est le suivant :

$$C = \left[\frac{C_{\text{spectro}} * V_{\text{tot}} * V_{\text{ech}} * 10 * 100}{MS} \right] / 1000 \quad (3)$$

Avec :

C (g/100g MS) : Concentration en amidon

C_{spectro} (µg/mL) : Concentration de glucose lue au spectrophotomètre

V_{tot} (mL) : Volume total réactionnel

V_{ech} (mL) : Volume de l'échantillon

MS (g) : Masse de l'échantillon

La quantité dans chaque organe est alors définie comme :

$$\text{Quantité d'amidon ou sucres solubles} = \frac{C * MS}{100} \quad (4)$$

Avec :

C (g/100g MS) : Concentration en amidon ou sucres solubles

MS (g) : Masse sèche totale de l'organe considéré

4.5.3. Dynamique à court terme du ¹⁵N dans les branches

Pour les échantillons de feuilles prélevées au poinçonneur, afin d'éviter tout biais dû à l'hétérogénéité qu'il pourrait y avoir entre chaque disque de feuille prélevé, nous avons séparé en 2 chaque disque de feuille puis « poolé » les 5 moitiés (**Figure IV.20**). Ces échantillons ont été micropesés dans des microcapsules d'aluminium.

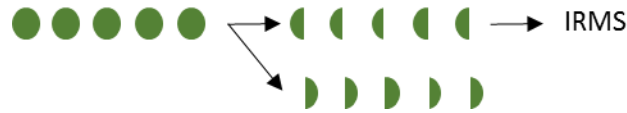


Figure IV.20. Schéma de la préparation des échantillons aux analyses isotopiques par IRMS.

Pour les échantillons broyés (feuilles entières et bois prélevés), des aliquotes de poudre ont alors été micropesées ($2\text{mg}\pm 0,5$) dans des micro-capsules d'aluminium sur une balance de microprécision (Mettler Toledo XPR).

Tous les échantillons ont été analysés avec un analyseur élémentaire (NA 1500 NCS, Carlos Elba, Milan, Italy) couplé avec un spectromètre isotopique de masse (IRMS, Finnigan-Mat, Thermoquest Corp, San Jose, CA, USA) sur la plateforme SILVAtech.

L'abondance isotopique pour N en atom% est définie comme :

$$A_{\text{N}\%} = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}+{}^{15}\text{N}} \times 100 \quad (5)$$

$${}^{15}\text{N}_{\text{excess}} = A_{\text{N}\%} (\text{labeled compartment}) - A_{\text{N}\%} (\text{unlabeled compartment})$$

Avec :

$A_{\text{N}\%} (\text{labeled compartment})$: Abondance en azote 15 dans l'organe considéré

$A_{\text{N}\%} (\text{unlabeled compartment})$: Abondance naturelle en azote 15 dans un organe similaire non marqué.

La concentration en ${}^{15}\text{N}$ incorporé lors du marquage au sein de la feuille ou des protéines est la suivante :

$$\text{concentration } {}^{15}\text{N} = {}^{15}\text{N}_{\text{excess}} \times \frac{[\text{N}]}{100} \times 1000 \quad (6)$$

Avec :

N (g/100g MS) : Concentration en azote dans l'organe considéré.

La quantité de ${}^{15}\text{N}$ incorporé après marquage pour un organe donné est donnée par la formule suivante :

$$\text{Quantité } {}^{15}\text{N} = \frac{\text{concentration } {}^{15}\text{N}}{1000} \times \frac{\text{MS}}{100} \quad (7)$$

Avec :

MS (g) : Masse sèche de l'échantillon

4.5.4. Allocation du ^{15}N à l'échelle arbre entier

Des aliquotes de poudre de chaque échantillon ont été micro-pesées (2mg \pm 0,5) dans des microcapsules d'aluminium sur une balance de microprécision puis analysées avec un analyseur élémentaire (EURO-EA3024, Eurovector, Redavalle, Italy, INRA Occitanie) couplé avec un spectromètre isotopique (Elementar, UK). Les calculs menant à la concentration en azote ou en azote 15 sont similaires à ceux présentés ci-dessus pour l'expérimentation « Dynamique à court terme du ^{15}N à l'échelle branche ». Pour avoir une estimation de la capacité de recyclage de l'azote foliaire des arbres au moment de la senescence, nous avons prélevé des feuilles durant la saison de végétation et des feuilles dans le filet à litière.

Nous avons estimé la résorption azotée selon la formule suivante :

$$\text{NuR} = \frac{(\text{Xgr} - \text{Xsen}) * \text{MLCF}}{\text{Xgr}} * 100\% \quad (8)$$

Où NuR correspond à l'efficiencia de résorption azotée (en pourcentage), Xgr et Xsen correspondent aux valeurs de concentration en azote foliaire durant la saison de végétation et en fin de sénescence respectivement. MLCF correspond à un pourcentage de correction de perte en masse selon Vergutz *et al.* (2012), qui est de 0,78 selon les indications données par cette étude.

4.6. Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le modèle linéaire général pour tester l'effet facteur sur la variable considérée. Si les données ne remplissaient pas les conditions d'application des tests paramétriques, une transformation logarithmique a été effectuée sur les données de concentration et les résultats de partitioning ont subi une transformation arcsinus et racine carrée. Les différences ont été considérées comme significatives au seuil de 5%. Les figures et les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R, version 3.3.2 (R Development Core Team 2011). Plus précisément, au sein de chaque chapitre sera détaillée la méthode statistique employée.

Ci-dessous est présenté un tableau récapitulatif des différentes expérimentations effectuées et la construction en chapitre des prochaines sections (**Tableau IV.4**).

Tableau IV.4 Tableau récapitulatif des expérimentations menées au cours de ce travail de thèse articulé sous 4 articles. Liste des abréviations utilisées : C pour Témoin, D pour Défeuillés, Dr. pour sous sécheresse, H. pour hiver, P. pour printemps, E pour été et A. pour automne.

N°Article	Chapitre	Titre	Echelle d'étude	Métabolisme étudié	Contraintes	Prélèvements		
						2014	2015	2016
					C D Dr. Dead	H P E A	H P E A	H P E A
1	V	Dynamics of non structural carbohydrates (NSC) in 10 year-old Fagus Sylvatica L. Youngest twigs following experimental defoliation or drought which induced mortality	Branche	Carboné	X X X X	X	X	X X
2	VI	Short-term nitrogen dynamics are impacted by defoliation and drought in Fagus Sylvatica L. branches	Branche	Azoté	X X X		X X	
3	VII	Seasonal translocation of foliar nitrogen within beech trees and its tolerance to stress: a ¹⁵ N labeling approach	Arbre entier	Azoté	X X X		X	X X
4	VIII	What role does storage function play in the death of Fagus Sylvania L. trees?	Arbre entier	Carboné	X X X		X	X X

CHAPITRE 5:

Article 1: DYNAMICS OF NON STRUCTURAL CARBOHYDRATES (NSC) IN 10 YEARS-OLD FAGUS SYLVATICA L. YOUNGEST TWIGS FOLLOWING EXPERIMENTAL DEFOLIATION OR DROUGHT WHICH INDUCED MORTALITY (in preparation)

**V. DYNAMICS OF NON STRUCTURAL CARBOHYDRATES
(NSC) IN 10 YEARS-OLD FAGUS SYVATICA L. YOUNGEST
TWIGS FOLLOWING EXPERIMENTAL DEFOLIATION OR
DROUGHT WHICH INDUCED MORTALITY**

CHUSTE P.A¹, MAILLARD P.¹ and MASSONNET C.¹

¹INRA, UMR 1137 Forest Ecology and Ecophysiology, 54280 Champenoux, France

Correspondance author: catherine.massonnet@inra.fr

ABSTRACT

Plants acquire carbon via photosynthesis and use most of it as substrate to sustain their metabolisms (e.g respiration) and to build structural biomass. A smaller fraction is retained in the form of nonstructural carbohydrates (NSC). NSC pools are broadly referred as storage because they support metabolism at night and when carbon assimilation is insufficient to meet demand. In addition, NSC show a seasonal dynamic in deciduous trees. Mobilization and refilling of the NSC stores lead to fluctuations in these storage pools. As future climate scenarios under ongoing climate change predict that drought frequencies and intensities will increase in several regions worldwide, the ability to understand future tree response to and survival of water deficit has become increasingly important. Due to the critical role of storage for survival under stress, these predicted changes have led to a recent renewed interest in NSC storage, which is increasingly acknowledged as a key component in tree and ecosystem models. Despite their critical role in the plant carbon balance, our understanding of the dynamics of NSC in perennial plants remains limited. Seasonal dynamics of NSC have been well assessed in several temperate forest key species (*Quercus*, *Fagus*). However, the contribution of stored NSC to sustain internal plant metabolisms against abiotic stress or the existence of NSC thresholds in these species are poorly understood. Our main goal is to explore seasonal NSC dynamics and their potential biological significance in the context of extreme constraints. To do that, we used a dedicated experimental design with 10-year-old *Fagus sylvatica* L. which have been submitted for three years to repeated artificial defoliation and intense soil water deficit. NSC concentrations (soluble NSCs and starch) in twigs of control and stressed trees were assessed at key physiological dates during each season from 2014 to 2016. We found that following three years of treatments, NSC concentrations were altered in response to extreme constraints, starch and others soluble sugars had different patterns meaning a different biological significance. Our results seems to indicate that slight but crucial change of sugars composition have led to increase survival of trees under severe water deficit treatment.

Keywords: soil water deficit, defoliation, soluble sugars, *Fagus Sylvatica* L., Non-structural carbohydrates, branches, osmoregulation

5.1. Introduction

Climate change might result in more intense and more frequent drought events particularly in temperate regions (IPCC, 2013). Even if forest ecosystems are known to be resilient and have faced to disturbance for century, this climate-mediated increases in disturbance could be exceed the capacity of forest to cope with such rapid changes (Reyer *et al.*, 2015; Seidl *et al.*, 2016). Indeed, recent evidence of drought-induced mortality has been reported in many regions of the world resulting of a renewed interest in studying forest mortality in the scientific community (McDowell *et al.*, 2008; Sala *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2010; Anderegg *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016). Relevant key physiological mechanisms are needed for models to reliably predict forest responses to environmental changes especially when mortality occurs (McDowell *et al.*, 2013) and carbon metabolism is one of these (Martinez-Vilalta *et al.*, 2002; McDowell *et al.*, 2008).

Trees fix CO₂ from atmosphere via photosynthesis that allows providing critical source of C for various sinks such as growth, respiration, turgor maintenance, supply solutes for water movement or into mechanisms involved in defense (Chapin *et al.*, 1990; Korner, 2003; Sevanto *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2015). According to the time in the season and the environmental conditions the carbon source-sink balance may lead to periods of carbon surplus or deficit. For example, when soil water content becomes limiting, trees close their stomata to limit their water loss by transpiration but this impacts also negatively the photosynthesis (Bréda *et al.*, 2006; Palacio *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2013; Piper and Fajardo, 2014; Dickman *et al.*, 2015). Consequently, the carbon balance may become negative (McDowell *et al.*, 2008; Rowland *et al.*, 2015). To face to temporary negative carbon balance trees can use carbon stored in their perennials organs under form of starch and soluble sugars which constitute the non-structural carbohydrates (NSC). NSC quantity are dynamic within the seasons especially on deciduous trees, with increase starch concentrations in woody tissues at the end of the growing season (Barbaroux *et al.*, 2003; Damesin and Lelarge, 2003; Dietze *et al.*, 2014; Sevanto *et al.*, 2014; Hartmann *et al.*, 2016). These NSC are then used to maintain the winter metabolism during the non-leafy period (cold tolerance, maintenance respiration) and are also fundamental for new leaf growth during the next spring (Penning de Vries, 1975; Sakai and Larcher, 1987; Wanner and Junttila, 1999; Ogren, 2000).

When photosynthesis is altered by drought or by a loss of photosynthetic tissue through defoliation or branch mortality it has been hypothesized that trees are forced into C storage

dependency to meet continuous carbon demand for osmoregulation, respiration and defense against pathogens (McDowell *et al.*, 2008; Sala *et al.*, 2012). In the long term, trees might not survive if carbon supply by photosynthesis and stored NSC does not meet overall carbon demands (Martinez-Vivalta *et al.*, 2012). Several studies have focused on the role of carbon in mortality processes but this role needs more investigations because contradictory results were observed about NSC dynamics under disturbances (Piper, 2011; Hartmann *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013) as summarized in a recent report by Alice Delaporte (2015, thesis).

In the cohort of organs involved in carbon metabolism under drought, leaves play a crucial role in balancing the risks of carbon starvation and hydraulic failure through stomatal regulation, since they are the site of carbon assimilation and sugar production, as well as the main source of water loss for trees. Consequently, by bearing leaves and being the more proximal perennial organs of the new photoassimilate production, we hypothesized that twigs have a critical role in carbon acquisition strategy. Indeed, with the study of twigs, we search for a good proxy of the metabolic adjustments made under stressful conditions but little is known about the specific response of twigs which support leaves (Salmon *et al.*, 2015). Moreover, when disturbances such as drought or defoliation limit growth, change of NSC concentration should take place in tissues proximate to those where primary growth occurs, e.g. twigs (Bazot *et al.*, 2013; Piper *et al.*, 2016) because trees usually cover their demand by first mobilizing stored resources from the closest possible storage sites (Landhausser and Lieffers 2003).

NSC are mainly formed by both starch and soluble sugars. Soluble sugars and starch have different functions: while starch acts as a buffer, soluble sugars are involved in immediate metabolic functions such as defense, respiration, growth, osmoregulation ... (Dietze *et al.*, 2014). Whereas depletion of soluble sugars is very rare, starch depletion can be found in some organs (Martinez-Vivalta *et al.*, 2012). One mechanism which has a crucial role to prevent mortality is the possible interconversion from long chain of carbon products to smaller ones by the intermediate of an enzyme such as amyloglucosidase which can cut starch granules into fructose and glucose (Schimpf and Stosser, 1984; Lacombe *et al.*, 1993). Such interconversion is only possible under sufficient amount of water and under a certain range of temperature (Sauter, 1967; Sauter and Ambrosius, 1986). But interconversion from starch to lower C products are not the only possible mechanisms of interconversion because glucose and fructose can combine to form sucrose, the main form of sugar used for transport. By studying different

sugars through starch to smaller ones, we can have a better idea of metabolic adjustment operate under disturbance.

In this study, we propose to get further in the understanding on how tree cope with disturbance which can lead to mortality by investigating the effect of extreme drought stress or defoliation on NSC concentrations and more particularly on the composition of individual sugars in specific organs, proximal twigs, on *Fagus Sylvatica* L. trees, a deciduous broadleaf species, widespread in Europe. The current distribution of *F.Sylvatica* L. is limited by cold winters in the east, drought in the south and long winter and freezing events in the north. Beech trees grows typically on moderate dry to moderately moist soil conditions (Ellenberg and Leuschner, 2010). Numerous dendrochronological and ecophysiological studies suggest that European beech growth is more sensitive to disturbance like drought than others major broad-leaves species in Europe (Dulamsuren *et al.*, 2016) but it has been also reported that seedlings recover quickly from severe drought episodes (Aranda *et al.*, 2005 ; Gallé and Feller, 2007) and might indicate that local internal physiological adjustments could occur. One key to partially understand this particularity of beech sensitivity is to study to response in term of sugars concentrations and compositions which might be reflect the physiological adjustments operate when beech is under severe disturbance.

In the present study we explored, at key phenological stages for NSC dynamics in beech (Barbaroux *et al.*, 2002) the influence of a defoliation or a drought on seasonal patterns of of twigs carbon reserves. We focused on starch and soluble sugars by detailing main specific sugars. We made the following hypotheses: (1) we made the hypothesis that working on twigs might be a good proxy of NSC dynamics and, consequently, we would be able to find the same dynamics that was found in previous study on beech (2) Then, under soil water deficit or defoliation, the concentration of low-weight sugars will be increase due to interconversion of starch into sucrose, glucose or fructose to cope with specific metabolic demand (*e.g* osmoprotection). (3) Finally, when mortality occurs, we expect more starch depletion than soluble sugars depletion.

5.2. Materials and methods

5.2.1. Site and experimental design

The study was conducted on European beech trees. In 2006, beech seeds were collected in several forests in the Lorraine region of France and sown in 2007 in biodegradable horticultural pots made of wood fiber and filled with a peat and sand mixture. The seedlings were grown for one year in a nursery (INRA Grand-Est Nancy, France). In 2008, about 1000 of the seedlings were transplanted and grown for 7 more years in open ground at the INRA Grand-Est nursery (Champenoux, France, 48°75'N, 6°34'E, 229m asl). In 2014, a rain exclusion system was built above the 8-year-old trees: a semi-rigid structure supporting a transparent roof built with polycarbonate sheets and nets installed around the roof to intercept lateral rain. The trees under the roof were submitted to three different treatments for three years (2014, 2015, 2016): (1) control (C) in which the trees were regularly irrigated (n=336 trees); (2) defoliation (D) in which the trees were submitted to a yearly defoliation and regularly irrigated (n=336 trees). Manual defoliation of the trees in treatment D was done in June for the two consecutive years (2014 and 2015) and consisted in 75% of removal of the whole foliage, making sure the removal was homogeneously distributed throughout the tree crown. In 2016, a third manual defoliation was made earlier in the vegetative season (May) and at a higher severity (90% of removal) to constraint more C metabolism; (3) drought (Dr.) where the trees were submitted to soil water deficit (n=336 trees). The drought stress level were not designed to realistically simulate a climate change scenario, but rather to create drought conditions that were so unfavorable that they would likely cause beech mortality. The soil in the drought treatments was isolated by a rigid waterproof plastic sheet 1.80 meters depth buried vertically around the area. The water status of the seasonal sub-sets of trees in each treatment (8 trees per treatment) was checked by measuring pre-dawn water potential in twigs (ψ_{pd}) montly during vegetative season in 2014, 2015 and 2016. We sampled the twigs (one per tree) before sunrise and performed the ψ_{pd} measurement with a pressure chamber (PMS Instruments, Albany, OR, USA). At the end of each vegetative season, height and diameter were measured using a caliper or a beam respectively.

5.2.2. Soil characteristics and soil water content measurements:

The studied site was characterized by 60cm-deep homogenous soil with an average texture (Silt: $61 \pm 1.28\%$; Clay: $27 \pm 0.98\%$; Sand: $12 \pm 0.66\%$), a pH comprised between 7.5 and 8, an organic matter content between 12.1 and 14.9 g.kg^{-1} (E Silva, 2010) and a total N comprised between 0.54 to 0.87 g.kg^{-1} . Below 60cm, the grey marl of the Jurassic inferior (Lotharingian) era was characterized by a swelling heavy clay soil with a relatively high bulk density.

We used neutron probes (TROXLER TX 4301, Research Triangle Park, NC, USA) to measure the volumetric water content of the soil. Three neutron probe access tubes (aluminum, closed at their base) were installed in each of the four treatment areas in order to quantify water content at different depths: two ranged from 0-1m in depth and one ranged from 0-1.6m. During the growing season, measurements were carried out every two weeks. Counts were logged every 10 cm for the upper 100 cm, and every 20cm below that.

For each depth i (thickness t_i), Total Available Water soil Content (TAWC in mm) was calculated by estimating the characteristic points from pedotransfer classes for gravimetric soil moisture at field capacity (θ_{fc}) and gravimetric soil moisture at wilting point (θ_{wp}). The characteristic points were checked and adjusted with probe measurements, during winter for volumetric soil moisture at field capacity and during summer for volumetric soil moisture at wilting point. Soil bulk density was assessed with the cylinder method. Relative Extractable soil Water (REW in %) was calculated according to Bréda et al. (1995) as follows:

$$\text{REW} = 100 * \frac{\text{TAWC} - R}{\text{TAWC}} \quad (9)$$

where R is the actual volumetric soil water content in mm, and total soil extractable water content down to 1.60m is estimated to 310 mm.

The soil in the C and D treatments was irrigated regularly throughout the experiment with an automatic drip watering system which delivered between two and four liters per tree two to three times a week. We adjusted the amount of the water according to the REW measurements in order to avoid any water shortage ($\text{REW} > 0.4$), with 40% of the REW corresponding to the critical threshold where trees start to avoid water loss by closing their stomata (Granier *et al.*, 1999).

5.2.3. Sampling protocol

Twenty-four trees (8 C; 8 D; 8 Dr.) were randomly chosen. Additional dead trees were chosen when mortality occurred (n=4 in October 2015, June 2016 and Octobre 2016). We have determined mortality on the base of sudden dryness of leaves and a change of color of the trunk (for dead trees taken in October) and trees which did not present budburst for dead trees taken in May. From October 2014 to October 2016, each year, twigs were sampled at two key phenological dates i.e., i) at the theoretical minimum of NSC in May, 3 weeks after the end of leaf expansion, and ii) at the theoretical maximum of NSC in October, at the end of vegetative season. For each sampling date, three twigs were sampled on each trees. We took three twigs located at the crown at breast-height and made sure that twigs were representative of all twigs in the sampled trees and they were with enough material. Each sampled twigs was divided by annual growth unit between one-year-old twigs and current year-old twigs. One-year-old twigs were sampled at each date but current-year twigs were sampled only at end of each vegetative season because in May they were still undergoing lignification. We took off dormant buds. We were not able to make our samping during precise hours of the days, consequently, leaves samples were not assessed in this study. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C. All samplings were then freeze-dried (Dura-Top^(r), Dura-Dry^(r), FTS Systems^(r), Stone Ridge, NY, USA), weighed and ground into a fine powder with a ball mill (CEPI SODEMI CB2200, Cergy, France). The scheme of the experiment is presented in **Figure V.1**.

5.2.4. Non-structural carbohydrate analyses

Soluble sugars were extracted from 10 mg (± 0.5) of each sample with 1 mL of 80% (v/v) ethanol/water at 80°C for 30 mn and then centrifugated at 10,000g for 10 min at 4°C. This step was repeated three times and the resulting supernatants were pooled together. The pellet was retained at -20°C waiting for starch analysis and the supernatants, containing soluble sugars, were dried overnight with a vacuum evaporator (Heto Maxi Dry Lyo Freeze-dryer) to eliminate ethanol. Dried extracts were rehydrated in 1.5 mL of ultrapure water, redissolved on ice by sonication and then filtered at 0.2 μ m. Main simple sugars (sucrose, glucose, fructose, raffinose,) concentrations were determined by peak height measurements against standard calibrations on ionic chromatography (Dionex, Thermo Scientific, USA). Others sugars were also found but at lowest concentrations and they were summed as “others sugars”. The pellet was hydrolyzed with 0.02N NaOH for 30 min at 100°C, then cooled at ambient temperature, and

hydrolyzed in glucose molecules with amyloglucosidase (from *Aspergillus Niger*, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for 30 mn at 50°C. Glucose was quantified using hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase followed by spectrophotometric determination of NADPH formation at 340 nm (Boehringer, 1984). Soluble sugars and starch concentrations were expressed in g.100g⁻¹ DM.

5.2.5. Quantity and partitioning calculations

The quantity of differentiate sugars is defined as (2):

$$\text{Sugar quantity (g)} = \frac{\text{Sugars concentrations} * \text{Weight (DM)}}{100} \quad (10)$$

Partitioning of sugars is represented as the ratio (%) of the amount of a given sugar relative to the total amount of sugars (3).

$$\text{Given sugars ratio (\%)} = \frac{\text{Given sugar quantity}}{\text{Quantity of total sugars}} * 100 \quad (11)$$

5.2.6. Statistical analyses

We used general linear mixed-effect models to study seasonal pattern of predawn water potentials from 2014 to 2016. We included treatment and date of sampling as explanatory fixed factors and predawn leaf water potentials as a responses variable. Individual trees were modeled as a random factor. Similar general linear mixed-effect models were also used to study the growth of trees, NSC concentrations, total soluble sugars and differentiated soluble sugars under the three treatments and in the dead trees. If distribution was not normally distributed, a logarithmic transformation was used. Normality and homoscedasticity of standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-vs-predicted plots. When a significant effect or interaction between effects were underlined, post-hoc tests were performed. Data were analyzed with the R software package (<http://www.r-project.org>, version 3.2.2, 2016-10-31). Values are presented as average \pm SE. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

5.3. Results

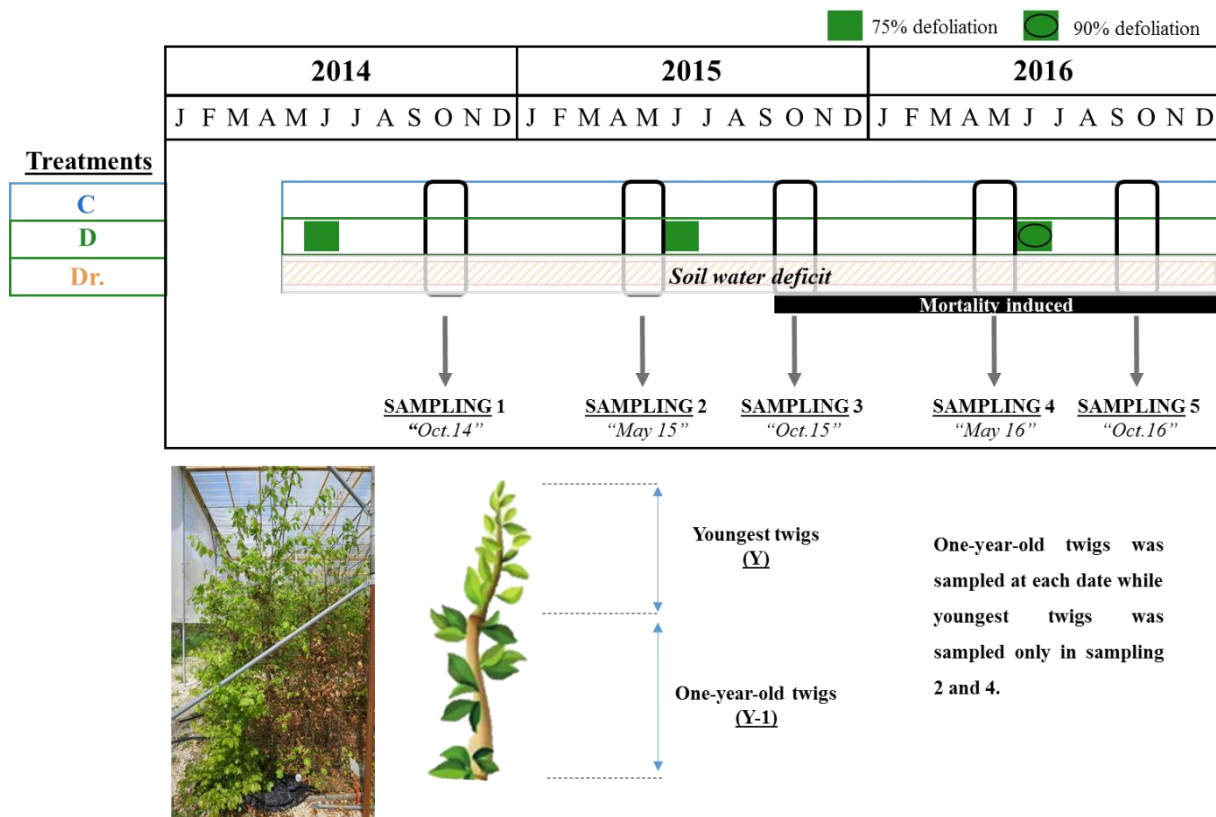


Figure V.1. Schematic representation of the NSC sampling experiment. Experimental schedule (A): Three treatments were applied over three years (2014, 2015 and 2016) with control (C), defoliation (D) and soil-water-deficit (Dr.). Two intensities of defoliation were applied with 75% of removal in 2014 and 2015 and with 90% of removal in 2016. Three branches per tree (24 trees, 8 in each treatment) were randomly chosen at each date and divided into annual growth. From 2015, twigs of dead trees were also sampled using the same procedure than living ones.

5.3.1. Monitoring of water changes in soil and twigs

The seasonal monitoring of the relative extractable water (REW) in the soil showed a progressive increase in the soil water deficit parallel to a continuous decrease of REW during the growing season in drought treatments (**Figure V.2.A**). In drought treatment, REW was below 0.4 for the duration of the experiment, whereas REW for the irrigated control (C) and defoliated (D) treatments remained above 0.4. As a result of the progressive seasonal soil water

depletion, pre-dawn water potential (ψ_{pd}) in twigs of drought trees were always statistically lower than those of C and D trees during the whole time of the experiment (**Figure V.2.B**).

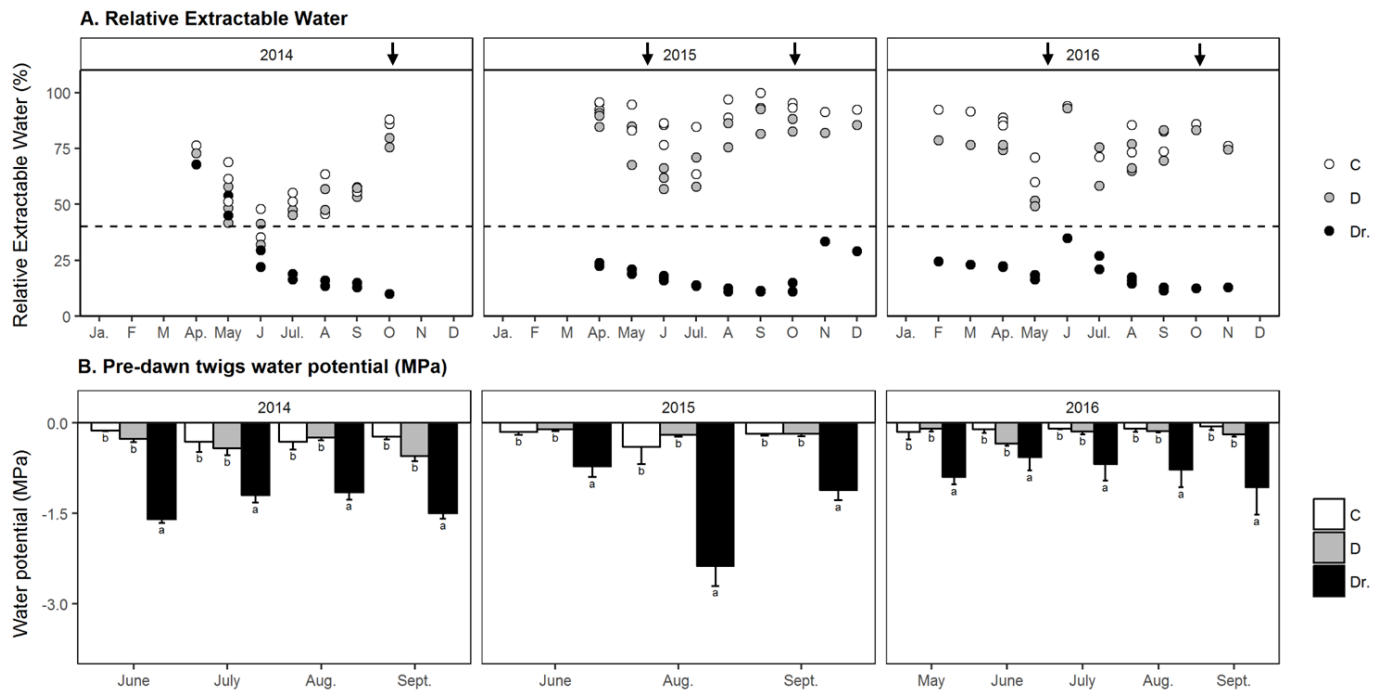


Figure V.2. Seasonal dynamics of the soil Relative Extractable Water during the growing season (REW, A) and the average of pre-dawn water potential of twigs (B) in 8-year-old beech trees since the start of the experiment in control (C), defoliated (D), soil water deficit (Dr.) treatments. Black arrows indicate the dates of the sampling. The dashed line indicate the threshold value of 40% of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al (1999). Different letters means a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date; mean \pm SE, $n=8$.

5.3.2. Growth responses to drought and defoliation

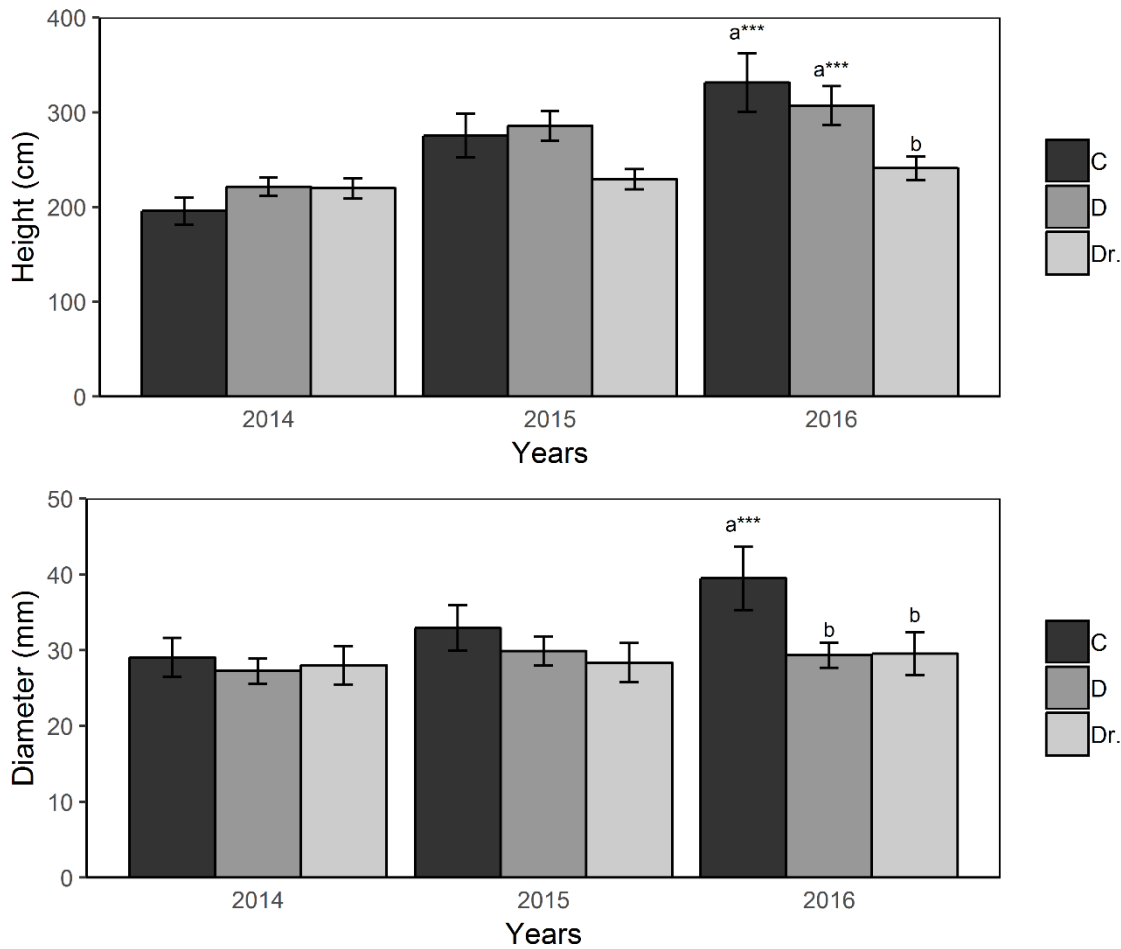


Figure V.3. Mean height (top, cm) and diameter (bottom, mm) soil water deficit (Dr.) or under defoliation (D), C is for control treatment, i.e well-watered trees and no defoliated in 2014,2015 and 2016. Mean \pm SE. Different letters indicate significant difference between treatment for a given date while stars indicate a significant effect of time between 2014 and 2016, $n=8$.

At the consequence of soil water deficit, the height of drought trees was impacted quickly after the onset of treatment and showed lower height than control trees in 2016 ($p<0.001$) and also compared to defoliated trees ($p<0.05$) whereas defoliations had no effect on primary growth during three consecutive years (**Figure V.3**). In 2016, a significant effect ($p<0.05$) was found in D and Dr. trees on primary growth when comparing to the C trees. If we look at the effect of the time (e.g if height or diameter were different in 2016 compared to 2014), a significant effect

was found on D ($p<0.001$) and C ($p<0.001$) trees but no significant difference was found on trees under soil water deficit. Considering the diameter, the only effect of the time was noticed on C trees ($p<0.001$) but not on D and Dr. trees.

5.3.3. Responses of starch and soluble sugars concentrations to drought and defoliation.

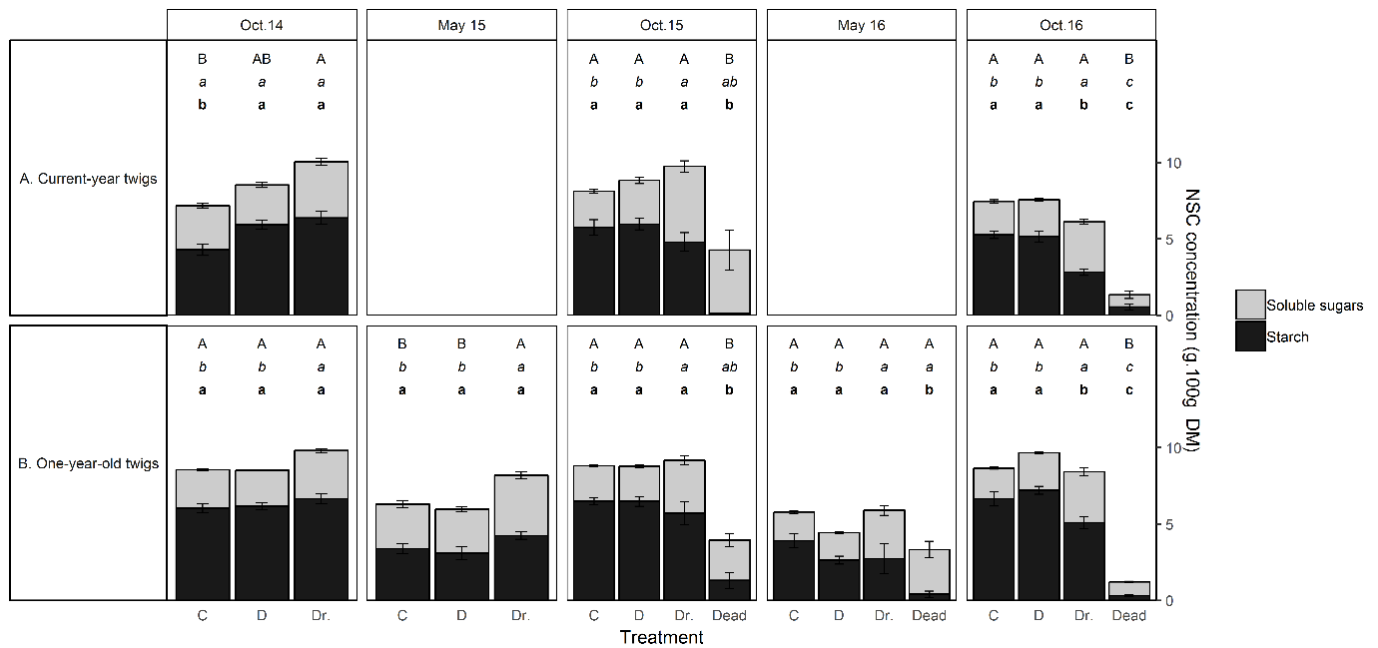


Figure V.4. Mean (\pm SE) concentration ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM}$) of starch (black) and total soluble sugars (grey) on twigs from current year of sample (A) and one-year-old twigs (B) on trees from of soil water deficit (Dr.) or under defoliation (D) since the start of the experiment. Current-year branches were only sampled at the end of each vegetative season. C is for control treatment. We sampled dead trees in October 2015 and 2016 and in June 2016. Lower lowercase bold letters indicates differences between treatments for starch concentration, middle italic letters is for soluble sugars and uppercase letters is for total NSC difference. $n=8$.

First, we checked the effect of time between two consecutive sampling dates on one-year-old twigs meaning if total NSC concentration was higher or lower between two consecutive dates (Figure V.4). On trees which were irrigated on non-defoliated (control), strong significant differences was found always between two consecutive dates ($p<0.001$). Similar results was

found on D trees ($p < 0.001$). However, the only effect of time between two consecutive sampling dates on trees under soil water deficit was found between October 2015 and May 2016 ($p < 0.05$).

Total NSC concentrations were not different between defoliated and control trees regardless the age of twigs but soil water deficit has an effect on total NSC concentrations in October 2014 on youngest twigs and in May 2015 on one-year-old twigs. When regarding only starch concentration, higher concentrations were found on D trees compared to C in October 2014 in youngest twigs and soil water deficit had an effect on starch concentrations only in October 2016 in youngest and one-year-old twigs. No difference were noticed on D trees regarding total soluble sugars concentration. Dr. trees exhibited higher soluble sugars concentration 6 month after the onset of drought treatment (October 2014), also in May and October 2015 and finally in May and October 2016.

Dead trees sampled in October 2015 displayed lower total NSC concentration and starch concentration but similar total soluble sugars concentrations. 24 month after the onset of drought treatment, dead trees which died from drought had lower starch concentration but similar NSC and soluble sugars concentrations. Finally, at the end of the experimentation and after 30 month of drought, lower NSC, starch and soluble sugars concentrations were found on dead trees compared to living ones.

5.3.4. Impact of drought and defoliation on concentrations of the main nonstructural carbohydrates.

Table V.1. Mean (\pm SE) concentration ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ DM) of main sugars (starch, sucrose, glucose, fructose, raffinose) in one-year-old twigs of trees submitted to soil water deficit (Dr.) or defoliation (D) since the start of the experiment. C is for control treatment. We sampled dead trees in October 2015 and 2016 and in June 2016, $n=8$.

Date	Treatment	Starch		Sucrose		Glucose		Fructose		Raffinose	
		$(\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM})$		$(\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM})$		$(\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM})$		$(\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM})$		$(\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{DM})$	
		Moy	ES	Moy	ES	Moy	ES	Moy	ES	Moy	ES
October 2014	C	6.04	± 0.29	2.28	$\pm 0.07^{\text{ab}}$	0.04	$\pm 0.01^{\text{b}}$	0.03	$\pm 0.00^{\text{b}}$	0.16	$\pm 0.02^{\text{b}}$
	D	6.17	± 0.24	1.92	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.07	$\pm 0.01^{\text{ab}}$	0.06	$\pm 0.02^{\text{b}}$	0.30	$\pm 0.02^{\text{a}}$
	Dr.	6.68	± 0.32	2.69	$\pm 0.06^{\text{a}}$	0.18	$\pm 0.04^{\text{a}}$	0.22	$\pm 0.06^{\text{a}}$	0.06	$\pm 0.01^{\text{c}}$
May 2015	C	3.39	± 0.33	2.11	$\pm 0.14^{\text{b}}$	0.32	± 0.08	0.47	$\pm 0.07^{\text{b}}$	0.02	± 0.01
	D	3.08	± 0.43	2.06	$\pm 0.08^{\text{b}}$	0.31	± 0.07	0.49	$\pm 0.06^{\text{b}}$	0.02	± 0.01
	Dr.	4.25	± 0.23	2.68	$\pm 0.13^{\text{a}}$	0.44	± 0.06	0.79	$\pm 0.10^{\text{a}}$	0.02	± 0.01
October 2015	C	6.50	$\pm 0.24^{\text{a}}$	2.08	$\pm 0.05^{\text{b}}$	0.03	$\pm 0.01^{\text{c}}$	0.02	$\pm 0.01^{\text{c}}$	0.19	$\pm 0.02^{\text{a}}$
	D	6.49	$\pm 0.33^{\text{a}}$	1.96	$\pm 0.08^{\text{b}}$	0.04	$\pm 0.01^{\text{c}}$	0.04	$\pm 0.02^{\text{c}}$	0.26	$\pm 0.03^{\text{a}}$
	Dr.	5.71	$\pm 0.76^{\text{a}}$	2.59	$\pm 0.30^{\text{a}}$	0.37	$\pm 0.16^{\text{b}}$	0.42	$\pm 0.14^{\text{b}}$	0.06	$\pm 0.01^{\text{b}}$
	Dead	1.32	$\pm 0.51^{\text{b}}$	0.47	$\pm 0.18^{\text{c}}$	1.01	$\pm 0.19^{\text{a}}$	1.06	$\pm 0.20^{\text{a}}$	0.01	$\pm 0.01^{\text{c}}$
May 2016	C	3.91	$\pm 0.46^{\text{a}}$	1.34	$\pm 0.07^{\text{a}}$	0.21	$\pm 0.02^{\text{b}}$	0.31	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.01	± 0.00
	D	2.65	$\pm 0.26^{\text{a}}$	1.13	$\pm 0.05^{\text{a}}$	0.27	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.40	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.00	± 0.00
	Dr.	2.75	$\pm 0.97^{\text{a}}$	1.01	$\pm 0.51^{\text{a}}$	1.06	$\pm 0.33^{\text{a}}$	1.06	$\pm 0.20^{\text{a}}$	0.01	± 0.01
	Dead	0.42	$\pm 0.20^{\text{b}}$	0.72	$\pm 0.28^{\text{b}}$	1.02	$\pm 0.18^{\text{a}}$	1.13	$\pm 0.15^{\text{a}}$	0.04	± 0.02
October 2016	C	6.66	$\pm 0.48^{\text{a}}$	1.66	$\pm 0.08^{\text{b}}$	0.08	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.07	$\pm 0.05^{\text{c}}$	0.19	$\pm 0.02^{\text{b}}$
	D	7.22	$\pm 0.26^{\text{a}}$	2.05	$\pm 0.04^{\text{b}}$	0.06	$\pm 0.01^{\text{b}}$	0.04	$\pm 0.01^{\text{c}}$	0.30	$\pm 0.01^{\text{a}}$
	Dr.	5.10	$\pm 0.40^{\text{b}}$	2.61	$\pm 0.18^{\text{a}}$	0.17	$\pm 0.06^{\text{b}}$	0.33	$\pm 0.09^{\text{b}}$	0.21	$\pm 0.03^{\text{b}}$
	Dead	0.27	$\pm 0.07^{\text{c}}$	0.00	$\pm 0.00^{\text{c}}$	0.85	$\pm 0.13^{\text{a}}$	0.74	$\pm 0.12^{\text{a}}$	0.00	$\pm 0.00^{\text{c}}$
Date	F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}	
Treatment	46.4	<0.0001	32.6	<0.0001	13.1	<0.0001	84.3	<0.0001	113.1	<0.0001	
Interaction Date x Treatment	1.17	0.3117	19.6	<0.0001	22.3	<0.0001	63.9	<0.0001	22.2	<0.0001	
	3.75	0.0003	3.27	0.0014	4.2	<0.0001	1.41	0.1885	10.05	<0.0001	

A strong effect of treatment (except starch) and date was found for all sugars and a strong interaction between them (**Table V.1**). Tree under defoliation displays same concentration of each NSC than control except for Raffinose in October 2014 and October 2016. Drought has

an effect on multiple sugars concentration in the short term after the onset of drought as represented by significant difference in sucrose, glucose and raffinose concentration in October 2014, sucrose and glucose concentration were still significantly different from control in May 2015. One year and a half after the beginning of soil water deficit, starch, glucose, fructose and raffinose concentrations were different from control whereas trees which died in the drought treatment displayed significant concentrations differences in all sugars from control. In May 2016, drought has an effect only on glucose and fructose concentrations and dead trees has lower starch and sucrose concentrations but higher fructose concentrations than control. Finally, in October 2016, drought has an effect on all sugars concentrations compared to control as same as dead trees.

5.3.5. NSC proportion

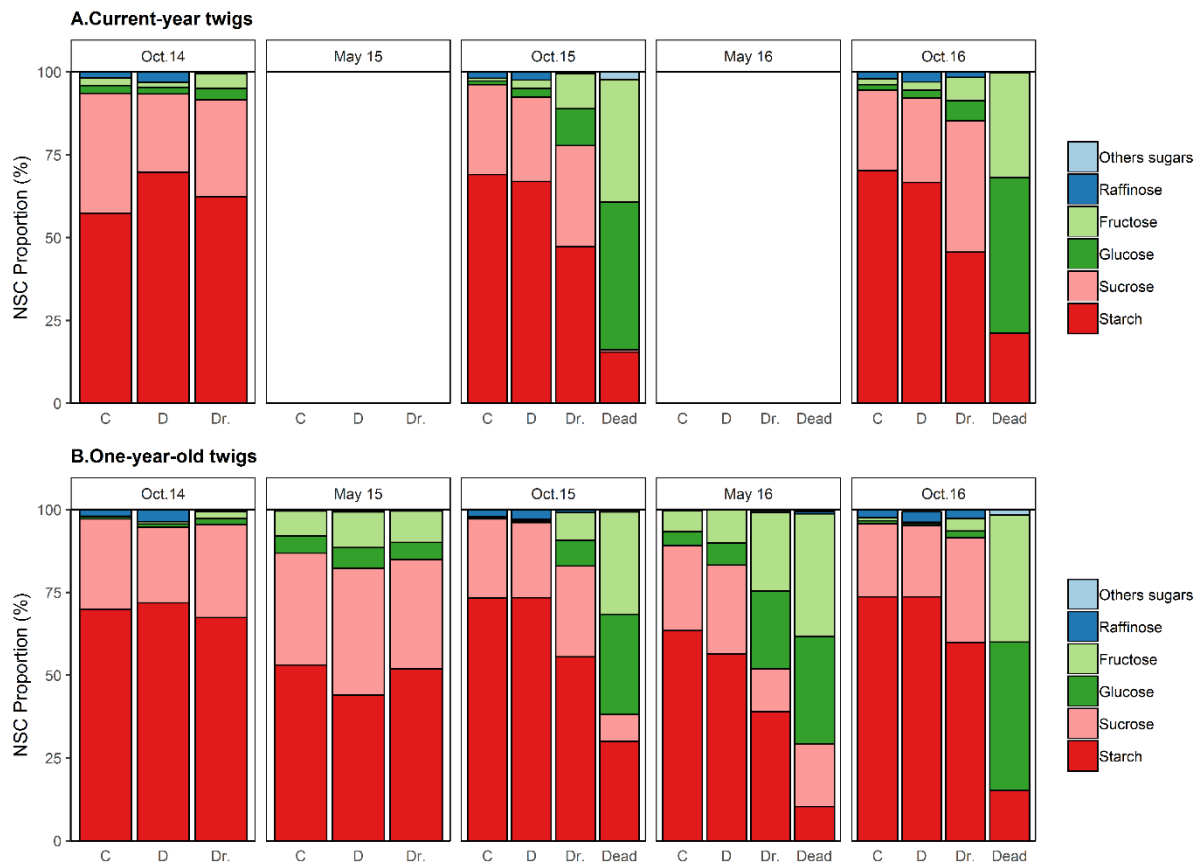


Figure V.5. Proportion (%) of differentiate sugars on current-year (A) and one-year-old (B) branches from tree under drought (Dr.) or under defoliation (D) or dead trees (Dead) since the start of the experiment, n=8.

For trees under control treatment, the highest proportion was starch the end of each vegetative season (average 70%) but C trees had a slight decrease of proportion of starch at the beginning of each vegetative season (average 55%) (**Figure V.5**). After starch proportion, the highest proportion of sugars were sucrose and fructose in May 2015 and 2016 but only sucrose in October 2014, 2015 and 2016. Similar ‘patterns’ were found on trees under defoliation. However, such results were not found on tree under soil water deficit. The proportion of starch decrease when drought time increase and the expanse of the increase of glucose and fructose proportion. Dead trees showed highest proportion for glucose and fructose while starch and sucrose were at minor proportion.

5.4. Discussion

Our first hypothesis was that twigs might be a good proxy to assess NSC dynamics. We found a strong significant effect of the time between two consecutive date of sampling on C trees with higher NSC concentrations at the end of vegetative season compared to the beginning of vegetative season. Our results was similar of those found on mature beech trees by Delaporte *et al.*, (2016) with higher NSC concentrations at the end compared to the beginning of vegetative season or by Bazot *et al.*, (2013) and Gilson *et al.*, (2014) on mature oak and a chronosequence of oak respectively.

Our study combine analysis of short and mid-term effect of two intensities of drought or a harsh defoliation on carbon storage dynamics. Under water stress, the behavior of young beech trees might be typical of an isohydric specie, with early stomatal closure that prevented desiccation while photosynthesis was shot down (McDowell *et al.*, 2008). Beech responses to drought might be determined mainly by the rate and degree to which water status is hydraulically regulated. Initially in our study, more than six hundred tree were either under defoliation or under drought treatment but, at the end of the study, 30 month later, no tree under defoliation died whereas 15% of trees under severe intensity of soil water deficit died during the experiment. Why some trees died while others survive is an important question which being debate in the scientific community (Manion 1981; Franklin *et al.*, 1987; Martinez-Vivalta *et al.*, 2002; McDowell *et al.*, 2008; Garcia-Forner *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2018) and the study of NSC dynamics could help for the understanding.

5.4.1. Twigs C metabolism was not impacted by photosynthetic tissue loss through defoliation

Despite three successive years of extreme defoliation (at 75% in 2014 and 2015 and at 90% in 2016), none of the defoliated trees died or showed evidence of die-back. A small effect was observed on both primary and secondary growth but only from 2016. Deciduous species, contrary to evergreen species (Harms and Mattson, 1992; Krause *et al.*, 1993), are known to be tolerant to herbivory (Piper and Fajardo, 2014; Piper, 2015). This is probably because deciduous species store their reserves in woody parts which are generally protect to herbivory (Millard *et al.*, 2001) whereas evergreen species stores also a significant part in the foliage. In our first initial hypothesis, we postulate that through loss of foliage due to defoliation, C metabolism would be impacted and result of difference on growth and NSC dynamics. However, following

defoliation, beech trees did not present significant growth reduction compared to control. However, when an effect of time was found on the diameter of C trees, no effect was noticed on D trees. Such result highlight that despite no significant difference between C and D trees, defoliation started to have an impact on secondary growth. On the same experiment site when studying leaf N concentration following defoliation, leaf N was higher after defoliation suggesting that possibly photosynthetic compensatory mechanisms occurs after a defoliation (**Chapitre V**) which has been also hypothesized in other studies (Canadell and Lopez-Sorian 1998; Eyles *et al.*, 2009). Increasing of photosynthetic rates following defoliation increase the amount of C products. Despite the loss of major photosynthetic products, we found same NSC dynamics than in control whereas no difference in terms of starch proportion were found. We could hypothesis that storage might be enhanced at the expense of growth especially in 2016 when the defoliation intensity were at the highest rate. However, explaining why secondary growth were constraint at the end of the experiment after three consecutive defoliation could be related with limitation of others crucial elements such as potassium or nitrogen (Palacio *et al.*, 2018).

5.4.2. NSC dynamics under soil water deficit

Our second initial hypothesis made the assumption that both drought intensity and duration had an impact on sugars concentration. In a first approach, by following the total NSC concentrations, we did not find significant differences among treatments. But the story behind is not ended because studies have shown that the composition in NSC types could be modified by stress conditions. Indeed in a response of severe soil water deficit, soluble sugars proportion can increase at the expanse of starch, probably in a result of interconversion soluble NSC – Starch (Mencuccini, 2014). Indeed, our results showed an increase of fructose and glucose proportion in expanse of starch in the severe soil water deficit treatment. Starch, sucrose, glucose and fructose are thought to make up >80% of NSC in temperate trees (Hoch *et al.*, 2003) but in our study of young beech trees, this pool of 4 non soluble and soluble sugars make up more than 95% of NSC, whatever the treatment. Soluble sugars has multiple metabolic roles (Hartmann *et al.*, 2016): for example, growth or defense (Dietze *et al.*, 2014; Fatichi *et al.*, 2014). Glucose and fructose can occurs as free monosaccharides or can be transformed into sucrose for transport (Gibon *et al.*, 2009) or used for osmoprotection of tissues against desiccation (Patakas *et al.*, 2002) by maintaining cell turgor by osmotic adjustment to improve drought adaptation (Upadhyaya *et al.*, 2013). However, less sucrose was found in the twigs of the Dr. trees. This could be due either to a possible interconversion from sucrose to glucose and

fructose since we have also found more glucose and fructose or to a transport of sucrose towards other organs such as belowground. On a study on the same experimental site, ^{13}C labelling has been made to examine how drought alters carbon transport from leaves to perennial part through phloem and they concluded that intensive drought affected phloem transport capacity (Dannoura *et al.*, 2018). Consequently, this result suggest that the decrease of sucrose is likely due to interconversion to osmoprotectant sugars or to transport. Our beech trees seems to privilege carbohydrate requirements for osmoregulation which can explain our low mortality rates.

5.4.3. NSC related to drought-induced mortality.

The mortality of trees under sever soil water deficit began in 2015 at the end of vegetative season when some trees began to be drier and finally, shed their leaves. We were expected that those tree were dead, sampled them, and it was confirmed at the beginning of the next vegetative season in 2016 when 2015- supposed-died trees did not burst their buds. Then, in 2016, others trees in drought treatment died also leading to a total percentage of tree mortality of 15%.

Now, we can ask what's happened for implying mortality on certain while others survived? Low mortality was enhanced firstly at the end of the second vegetative season under severe soil water deficit which reflect the high resistance of beech trees against severe water stress. Some reports highlight also that beech trees can be resistant and resilient against drought (Tegel *et al.*, 2014; Hentschel *et al.*, 2016). In a recent review, O'Brien *et al.*, (2017) defined key trait associated with drought-induced mortality in temperate trees which were wood properties, tree size and growth at the individual levels. The first common response of our young beech trees following drought was to reduce their stem growth which has been also found to decrease in others studies when subjected to soil water deficit (Voltas *et al.*, 2013; Hentschel *et al.*, 2016) and European beech are also known for their strong morphological plasticity (Schroter *et al.*, 2012). Moreover, we can exclude any mortality induced by biotic attacks given the fact that we were aware to prevent any external disease to weakness our young beech trees. Consequently, we could hypothesize that mortality could be a consequence of a local failure of hydraulic properties but hydraulic failure cannot be explain by itself otherwise we were find mortality earlier than after 18 month and especially at a higher rate. In 2015, after one year and a half of severe constraints, mortality occurs in our study and none of consequences presented above can explain by themselves why some trees died and others not. A combination of processes might explain the low mortality in our study. Interactions between water and C balance are numerous,

for example xylem and root growth, xylem embolism repair or osmotic regulation. Recovery of a functional xylem is the result of the replacement of embolized vessels with new functional ones (Brodribb *et al.*, 2010) and studies hypothesize that sugars play a crucial role in the creation of an osmotic driving force to refill embolized xylem vessels (Secchi and Zwieniecki, 2011; Bloemen *et al.*, 2016). We observed NSC concentration significantly lower in twigs of dead trees than living trees indicating that potential local NSC depletion could occur. More than local NSC depletion, our study highlight potential interconversion indicated by decrease of starch concentrations combined with decrease of soluble sugars concentrations in dead trees. Interestingly, sucrose proportion was lower in dead trees than living ones indicating also a possible sucrose conversion to glucose and fructose. We found lower starch concentration but no total starch depletion. Starch depletion was rarely observed in studies, for exemple, only in roots (Hartmann *et al.*, 2013). This result confirmed one of our initial hypothesis which is that more than depletion, availability might be more important (Sala *et al.*, 2012; Pantin *et al.*, 2013; Deslauriers *et al.*, 2014). In case of low water availability, the transport of NSC from source to sink could be disrupted and lead to mortality, which might be the case in our study and the research of minimum threshold of NSC concentrations required for survival could be like the Quest for the Grail.

5.5. Conclusion

Our results emphasize the tight C regulation which might occur on twigs under defoliation or drought. We found that under a long period of soil water deficit, local C storage seems to be previligiated but when drought became longer and still harsher, the need of C for osmoregulation lead to the breakdown of starch and might improve the chance of survive under severe soil water deficit. However, we also found that twigs from dead trees exhibited very low content of NSC which indicate that C content play a role when mortality occurs. In the other way, tree which loss a huge part of photosynthetic tissue maintain their C storage strategy all along the experiment. All these results argue for the high survival capacities of young beech trees to extreme constraint.

CHAPITRE 6:

**Article 2: SHORT-TERM NITROGEN DYNAMICS
ARE IMPACTED BY DEFOLIATION AND
DROUGHT IN FAGUS SYLVATICA L. BRANCHES
(in press in Tree Physiology)**

6. SHORT-TERM NITROGEN DYNAMICS ARE IMPACTED BY DEFOLIATION AND DROUGHT IN *FAGUS SYLVATICA* L. BRANCHES

Pierre-Antoine Chuste¹, Catherine Massonnet¹, Dominique Gérant¹, Berndt Zeller², Joseph Levillain¹, Christian Hossann¹, Nicolas Angeli¹, Rémi Wortemann¹, Nathalie Bréda¹, Pascale Maillard^{1*}

¹UMR 1434 SILVA, INRA, Université de Lorraine, Agroparistech, 54280 Champenoux, France

²UR 1138, INRA, Description of the Biogeochemical Cycles in Forest Ecosystem, 54280 Champenoux, France

Running head: Nitrogen dynamics in beech branches under defoliation and drought.

***Corresponding author:** Dr Pascale MAILLARD, INRA Grand-Est Nancy, UMR 1434 SILVA, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France.

Phone number: +33 (0)3 83 39 41 37

Email: pascale.maillard@inra.fr

ABSTRACT

The predicted recurrence of adverse climatic events, like droughts, which disrupt nutrient accessibility for trees, could jeopardize the nitrogen (N) metabolism in forest trees. Internal tree N cycling capacities are crucial to ensuring tree survival but how the N metabolism of forest trees responds to intense, repeated environmental stress is not well known. For two years, we submitted 9-year-old beech (*Fagus Sylvatica* L.) trees to either a moderate or a severe prolonged drought or a yearly removal of 75% of the foliage to induce internal N cycling changes. During the 2nd year of stress, in spring and summer, we sprayed ¹⁵N-urea on the leaves (one branch per tree). Then, for 14 days we traced the ¹⁵N dynamics through the leaves, into foliar proteins and into the branch compartments (leaves and stems segments), as well as its long-distance transfer from the labeled branches to the tree apical twigs. Defoliation caused a short- and mid-term N increase in the leaves, which remained the main sink for N. Whatever the treatment and the date, most of the leaf ¹⁵N stayed in the leaves and was invested in soluble proteins (60 to 68 % of total leaf N). ¹⁵N stayed more in the proximal part of the branch in response to drought compared to other treatments. The long-distance transport of N was maintained even under harsh drought, highlighting efficient internal N recycling in beech trees. Under extreme constraints creating an N and water imbalance, compensation mechanisms operated at the branch level in beech trees and allowed them (1) to maintain leaf N metabolism and protein synthesis and (2) to ensure the seasonal short- and long-distance transfer of recycled leaf N even under drastic water shortage conditions.

Keywords: soil water deficit, defoliation, *Fagus sylvatica* L., stable isotope labeling, nitrogen cycle, protein

6.1. Introduction

Nitrogen (N) is a fundamental macronutrient, the availability of which determines growth, development and productivity in plants (Finzi *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2016). The influence of soil N availability on tree growth has been widely studied (Canham *et al.*, 1999, He *et al.*, 2009, Simon *et al.*, 2011 and 2017). Trees acquire N from the soil through their roots and associated ectomycorrhizae in both inorganic (nitrate and ammonium) and organic (amino acids, peptides) forms, and also from the atmosphere through N deposition on leaves (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010, Nair *et al.*, 2015). Trees are able to store and remobilize N along the seasons, and this internal N recycling is also an important source of N for their development (Staswick 1994, Neilsen *et al.*, 1997). In spring, in deciduous trees, root N uptake is still limited and winter stored N sustains the growth of the new foliage (Millard and Grelet, 2010). As examples, in young apple trees, Cheng and Fuchigami (2002) showed that about 50% of a tree's N content was remobilized to support new shoot and leaf growth, whatever the tree's N status; in mature sessile oak, El Zein (2011) showed that, during the two weeks following budburst, remobilized N contributed to more than 90% of the total N in twigs and growing leaves. This high investment of stored N in new tissues is key to supporting photosynthetic processes. On one hand, leaf photosynthetic capacity has been shown in many plant species to be highly correlated with leaf N content, since the N invested in the Calvin cycle and thylakoid proteins represents up to 75% of total leaf N (Evans and Seemann, 1989). On the other hand, the primary assimilation of inorganic N requires carbon skeletons and an energy supply (Dong *et al.*, 2002), which reflects the close interrelation between carbon and nitrogen metabolisms in plants.

In the context of climate change, various studies have pointed out the threat of adverse climatic events on forest vulnerability (Anderegg *et al.*, 2015); in particular, extreme drought events have been identified as a major cause of forest dysfunction (Bréda *et al.*, 2006, Bréda and Peiffer, 2014). Water stress has complex and interrelated consequences on water and carbon metabolisms (McDowell *et al.*, 2011). Mineral nutrients, especially N, are also likely to be impacted by recurrent droughts, predicted in climate-change scenarios, which will decrease both nutrient availability in the soil (notably by decreasing microbial activity) and nutrient/water uptake by the fine roots (Kreuzwieser and Gessler, 2010). Fotelli *et al.*, (2002, 2004) used stable isotopic methods such as ¹⁵N labeling, to study the physiology of N uptake from the soil and its transport through trees from roots to shoots; they found a net reduction in

N uptake by trees in the case of soil water shortage. In temperate forests, a direct loss of available N can be also observed in the case of tree defoliation (Lovett *et al.*, 2002), which may be caused by various biotic and abiotic disturbances such as insects, frost, wind or hail (Ozolincius and Stakenas, 1996, Lorenz and Becher, 2012).

In the present study, we investigated the effects of repeated extreme drought and defoliation events on metabolism and the export of N within the leafy branches of 9-year-old beech trees (*Fagus sylvatica* L.), a deciduous broadleaf species widespread in Europe, and which is known to be sensitive to severe drought (Peuke *et al.*, 2002). We hypothesized that the N metabolism in the beech branches would be affected under defoliation, as shown for some forest tree species (Millard *et al.*, 2001), and under extreme drought, which has rarely been investigated (Jordan, 2015, Gessler *et al.*, 2016). Gessler *et al.*, (2016) suggested that reduced nutrient availability during drought induces a negative feedback on the carbon balance (by reducing N supply for the photosynthetic apparatus). Any reduction in N uptake induced by drought during the vegetative season would also affect tree N metabolism, more particularly, N assimilation in the leaves. Defoliation could also create a carbon and N limitation that would affect N assimilation in the remaining leaves.

In our experiment, planted beech trees were submitted for two years to extreme stresses (yearly manual defoliation or prolonged droughts) likely to induce changes in the trees' internal N cycle and eventually lead to an N shortage. The second year of stress, a short-term ^{15}N labeling pulse was applied on the leaves of one branch per tree i) at the end of spring N remobilization and ii) in summer, after the 2nd manual defoliation was done. The choice of these two periods was made to reveal i) whether a constraint applied for one year (drought or defoliation) would modify the N functioning in a given branch in the spring of the second year, and ii) how prolonged or repeated constraints impact summer N functioning. We evaluated whether the ^{15}N allocation between the leaves on the one hand and the bearing branch (short-distance transport) on the other hand was disturbed. In addition, we investigated whether ^{15}N allocation was reflected in the local metabolism priorities of source leaves, and how much stress conditions (i) altered soluble protein synthesis (protein concentrations are thought to increase under harsh conditions), and/or (ii) modified the N export from labeled leaves toward the apical shoot.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Experimental design and growth conditions

The study was conducted on European beech trees. In 2006, beech seeds were collected in several forests in the Lorraine region of France and sown in 2007 in biodegradable horticultural pots made of wood fiber and filled with a peat and sand mixture. The seedlings were grown for one year in a nursery (INRA Grand-Est Nancy, France). In 2008, about 1000 of the seedlings were transplanted and grown for 7 more years in open ground at the INRA Grand-Est nursery (Champenux, France, 48°75'N, 6°34'E, 229m asl). In 2014, a rain exclusion system was built above the 8-year-old trees: a semi-rigid structure supporting a transparent roof built with polycarbonate sheets and nets installed around the roof to intercept lateral rain. Light intensity, air temperature and vapor pressure deficit were monitored below the roof. The trees under the roof were subjected to four different treatments for two years (2014, 2015): (1) control (C) in which the trees were regularly irrigated; (2) defoliation (D) in which the trees were submitted to a yearly defoliation and regularly irrigated: manual defoliation of the trees in treatment D was done each year in June; 75% of the total foliage was removed and the removal was homogeneously distributed throughout the tree crown; (3) moderate drought (MD) and (4) severe drought (SD), where the trees were submitted to two levels of soil water deficit. The two drought stress levels were not designed to realistically simulate a climate change scenario, but rather to create drought conditions that were so unfavorable that they would likely cause beech mortality. In fact, lateral rain entering under the roof created some variability in soil water status in the drought treatment at the time of labeling and this allowed us to select trees with contrasting levels of water stress. The soil in the drought treatments was isolated by a rigid waterproof plastic sheet 1.80 meters depth buried vertically around the area. The water status of the seasonal sub-sets of trees in each treatment (24 trees per treatment) was checked by measuring pre-dawn water potential in twigs (ψ_{pd}) at day of year (DOY) 150, 176 and 198 in 2015. We sampled the twigs (one per tree) before sunrise and performed the ψ_{pd} measurement with a pressure chamber (PMS Instruments, Albany, OR, USA).

6.2.2. Soil characteristics and soil water measurements

The studied site was characterized by 60cm-deep homogenous soil with an average texture (Silt: $61 \pm 1.28\%$; Clay: $27 \pm 0.98\%$; Sand: $12 \pm 0.66\%$), a pH comprised between 7.5 and 8, an

organic matter content between 12.1 and 14.9 g.kg⁻¹ (E Silva 2010) and a total N comprised between 0.54 to 0.87 g.kg⁻¹. Below 60cm, the grey marl of the Jurassic inferior (Lotharingian) era was characterized by a swelling heavy clay soil with a relatively high bulk density.

We used neutron probes (TROXLER TX 4301, Research Triangle Park, NC, USA) to measure the volumetric water content of the soil. Three neutron probe access tubes (aluminum, closed at their base) were installed in each of the four treatment areas in order to quantify water content at different depths: two ranged from 0-1m in depth and one ranged from 0-1.6m. During the growing season, measurements were carried out every two weeks. Counts were logged every 10 cm for the upper 100 cm, and every 20cm below that.

For each depth i (thickness t_i), Total Available Water soil Content (TAWC in mm) was calculated by estimating the characteristic points from pedotransfer classes for gravimetric soil moisture at field capacity (θ_{fc}) and gravimetric soil moisture at wilting point (θ_{wp}). The characteristic points were checked and adjusted with probe measurements, during winter for volumetric soil moisture at field capacity and during summer for volumetric soil moisture at wilting point. Soil bulk density was assessed with the cylinder method. Relative Extractable soil Water (REW in %) was calculated according to Bréda *et al.*, (1995) as follows:

$$REW=100* \frac{TAWC-R}{TAWC} \quad (12)$$

where R is the actual volumetric soil water content in mm, and total soil extractable water content down to 1.60m is estimated to 310 mm.

The soil in the C and D treatments was irrigated regularly throughout the experiment with an automatic drip watering system which delivered between two and four liters per tree two to three times a week. We adjusted the amount of the water according to the REW measurements in order to avoid any water shortage (REW >0.4), with 40% of the REW corresponding to the critical threshold where trees start to avoid water loss by closing their stomata (Granier *et al.*, 1999).

6.2.3. Choice of the branch

One branch per tree was selected at chest height for the ¹⁵N labeling experiment. Branch diameter and the distance from the base of the branch to the apex of the tree were measured as were the number of leaves on the branch and individual and total leaf area. A significant global treatment effect was observed on the number of leaves and individual leaf area. Total leaf area

was influenced by season ($p < 0.01$) with a significant treatment x season interaction ($p < 0.01$). Defoliation did not decrease branch growth in 2014, but in 2015, branch diameter was significantly reduced in the defoliated trees. In the spring 2015, after the 2014 defoliation, the number of leaves on defoliated branches was similar to the number on the water-stressed and control branches. In the summer 2015, the selected branches in the D trees were thicker (diameter significantly larger) than the ones in the C trees and also contained more leaves than controls before 75% of defoliation.

6.2.4. Foliar ^{15}N labeling procedure

Labeling experiments were performed at two dates (**Figure VI.1**): 1) in spring, at the end of May 2015 (DOY: 148) when the leaves of all the trees were fully expanded, and 2) in summer, in July 2015 (DOY: 187) one month after defoliation had been performed on the D trees and when radial growth was maximal. At each date, spring and summer, a set of 12 trees per treatment (C, D, MD and SD) were randomly chosen for labeling (giving 48 trees for each date and 24 trees per treatment for the whole labeling experiment).

On each tree, a branch bag made of polyethylene was placed over the labeled branch to isolate it from its local environment. In the late afternoon, an aqueous solution of ^{15}N -urea was sprayed inside the bag onto the leaves with a hand sprayer (Zeller *et al.*, 1998). Urea is considered to be the most suitable form of N for foliar application due to its non-polarity, rapid absorption, low phyto-toxicity and high solubility (Knoche *et al.*, 1994, Zeller *et al.*, 1998). Leaves absorb N in urea much faster than N in mineral form (Zeller *et al.*, 1998) and urea N is rapidly converted into amino acids used for leaf protein synthesis or for N export (Dilley *et al.*, 1961, Dong *et al.*, 2002). The ^{15}N -urea solution (10.4 atom%, 5.0 g.L⁻¹) was sprayed in a fine mist, which limited the formation of drops and ensured a homogeneous labeling of the leaves. After the labeling, the branch bag was kept on all night, then very carefully removed the next morning to avoid any contamination among trees. The timing of the foliar labeling is summarized in **Figure VI.1**.

6.2.5. Sampling protocol

Leaf and twig samples were collected from 12 of the selected trees per treatment before labeling to determine their natural ^{15}N baseline abundance. After ^{15}N labeling, leaf material from each labeled branch was sampled over a chase period of 14 days. At three sampling dates (day 0.5, 1, 2), five small leaf disks (38 mm²/disk, 1 disk per leaf and per date) were removed with a

hole-puncher from five randomly selected leaves along the labeled branch. For the three dates, this sampling procedure was repeated on the same set of five leaves. At day 4, the remaining part of the five punched out leaves was taken. One additional leaf was also collected from six trees per treatment to assess total protein quantification and ^{15}N assimilation into proteins. We chose day 4 as a sampling date because the turnover of foliar proteins, especially Rubisco, is rapid enough to allow an incorporation of ^{15}N into foliar proteins within that time, as shown for ^{15}N labeled rice leaves by Suzuki *et al.*, (2001). At day 7, a second set of five leaves per branch was hole-punched as described above. At day 14, the whole branch (both wood and remaining leaves) plus several leaves from the terminal apical twig of the selected trees were harvested (**Figure VI.1**).

Each sampled branch was split by annual growth unit [current year (Y), 1-year-old (Y-1) and older (<Y-1)]. All samples were gently and carefully washed in distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The samples were then freeze-dried [Dura-Top (r), Dura-Dry (r), FTS Systems (r), Stone Ridge, NY, USA], weighed and ground into a fine powder in a ball mill (CEPI SODEMI CB2200, Cergy, France).

6.2.6. Foliar protein analysis

Soluble proteins were extracted from each leaf powder sample: 20 mg of leaf powder mixed with a ball mill (Retsch MM 301, GmbH & Co, Germany) in a micro-tube with 500 μL of extraction buffer [62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2 % (v/v) SDS, 10 % Glycerol and 28 mM DTT] twice for 45 seconds. The samples were centrifuged twice at 32,000 g for 20 min (17°C). Protein concentration from the solubilized pellet was determined by RC-DC Protein assay (Biorad RC DC Protein Assay 500-0121). Soluble proteins were precipitated with four volumes of cold acetone and 28 mM of DTT and stored at -20°C overnight. The following day, proteins were collected by centrifuging at 16,000g, 4°C for 10 min, then washed four times with 1.5 ml of cold acetone and 28 mM of DTT. After each washing, the mixture was stored 30 min at -20°C , then centrifuged at 16,000 g, 4°C for 15 min. The final pellet was air-dried at room temperature. Aliquots (1 mg) from the protein pellets were weighed into tin capsules for isotopic analyses.

6.2.7. Elementary and isotopic analyses

Total N concentrations (% of dry matter, DM) and ^{15}N isotopic abundance (atom%) of the wood and leaf samples were measured with an elemental analyzer (NA 1500 NCS, Carlo Erba, Milan, Italy) coupled to a Delta-S isotopic ratio mass spectrometer (Finnigan-Mat, Thermoquest Corp.,

San Jose, CA, USA). Analyses were carried out at the SilvaTec platform (UMR Silva, INRA Grand Est-Nancy, France).

6.2.8. Isotopic calculations

The isotopic abundance for N in atom% (A_N %) is defined as

$$A_N\% = \frac{^{15}N}{^{14}N+^{15}N} * 100 \quad (13)$$

The enrichment of ^{15}N (atom %) in each compartment (wood, leaves) is defined as

$$^{15}N_{\text{excess}} = A_N\%(\text{labeled compartment}) - A_N\%(\text{unlabeled compartment}) \quad (14)$$

where $A_N\%$ labeled compartment is the ^{15}N abundance of the labeled compartment, $A_N\%$ unlabeled compartment is the natural ^{15}N abundance of the unlabeled compartment, with a $A_N\%$ unlabeled compartment of about 0.368306888 ± 0.00306 atom% for leaves and $0.370893333 \pm 0.00127829$ atom% for wood. The same calculations were carried out for ^{15}N atom% in leaf proteins. The natural ^{15}N abundance [atom% of the unlabeled proteins] was 0.36606 ± 0.00011 .

The concentrations of ^{15}N ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ DM) incorporated by labeling in the Dry Matter (DM) of the leaf or in the leaf protein pool was calculated as:

$$^{15}N \text{ concentration} = ^{15}N_{\text{excess}} * \frac{[N]}{100} * 1000 \quad (15)$$

where [N] is the N concentration ($\text{mg} \cdot 100\text{mg}^{-1}$ DM) of the leaf or of the leaf protein extract.

The ^{15}N amount (g) incorporated by labeling in each compartment was calculated as

$$^{15}N \text{ amount} = \frac{^{15}N_{\text{concentration}}}{1000} * \frac{DM}{100} \quad (16)$$

where DM is the dry matter (g) of the compartment.

6.2.9. Total N and ^{15}N allocation in branches and ^{15}N partitioning in leaf proteins

Allocation of total N or ^{15}N is related to the distribution of N or ^{15}N within the different parts of the labeled branches (Dickson 1989). Allocation of N and ^{15}N represented the ratio (%) of the amount of N or ^{15}N incorporated into a given branch compartment (wood, leaf) relative to the total amount of N or ^{15}N incorporated in the corresponding whole branch.

$$Nor^{15}N_{allocation}(\%) = \frac{Nor^{15}N_{amount\ of\ the\ branch\ compartment}}{Nor^{15}N_{amount\ of\ the\ whole\ branch}} * 100 \quad (17)$$

Partitioning of N or ¹⁵N represented the ratio (%) of the amount of N or ¹⁵N incorporated into the leaf proteins relative to the total N or ¹⁵N amounts incorporated into the leaf DM.

$$Nor^{15}N_{partitioning}(\%) = \frac{Nor^{15}N_{amount\ \in\ leaf\ proteins}}{Nor^{15}N_{amount\ of\ the\ whole\ leaf}} * 100 \quad (18)$$

6.2.10. Statistics

We used general linear mixed-effect models to compare the seasonal dynamics of predawn water potential, tree growth, N and ¹⁵N concentrations and N allocation between dates and treatments. Normality and homoscedasticity of the standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-vs-predicted plots. When the distribution was not normal, a logarithmic or an arcsin (root square/100) transformation was used. Individual tree was a random factor while treatment and date of sampling were explanatory fixed factors in the models. A Tukey test was performed as a post-hoc analysis. Data were analyzed with the R software package (<http://www.r-project.org>, version 3.2.2, 2016-10-31).

6.3. Results

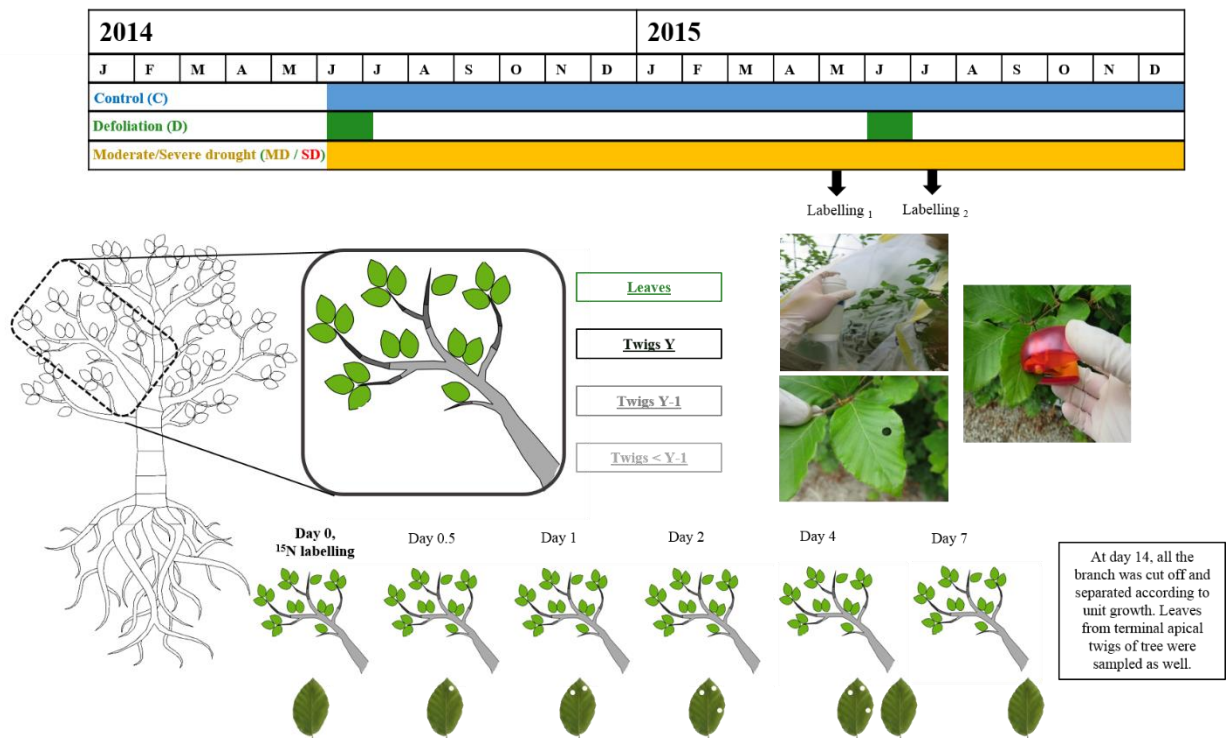


Figure VI.1. Schematic representation of the ^{15}N labeling experiment. Experimental schedule (top): Four treatments were applied over two years (2014 and 2015) with control (C), moderate (MD) and severe soil water deficit (SD) and defoliation (D) treatments (a 75% removal of the foliage, grey box). One branch per tree was labeled with enriched ^{15}N -urea on one set of trees in spring (LAB 1) and on a second set of trees in summer (LAB 2). Sampling procedure (bottom): At day 0, unlabeled leaves were taken to determine N% and baseline ^{15}N natural abundance. At day 0.5, a set of five leaves was hole-punched, then punched again at day 1, 2 and 4. At day 4, one intact leaf per tree was also sampled to estimate ^{15}N assimilation into foliar proteins. At day 7, another set of five leaves was hole-punched. At day 14, all the leaves and twigs from the labeled branch were harvested. Twigs were analyzed by annual growth unit (Y, Y-1 and <Y-1, where Y is year). In addition, leaves from the apical twigs were sampled to assess the long-distance transport of ^{15}N from the labeled leaves.

6.3.1. Changes in soil and twig water content

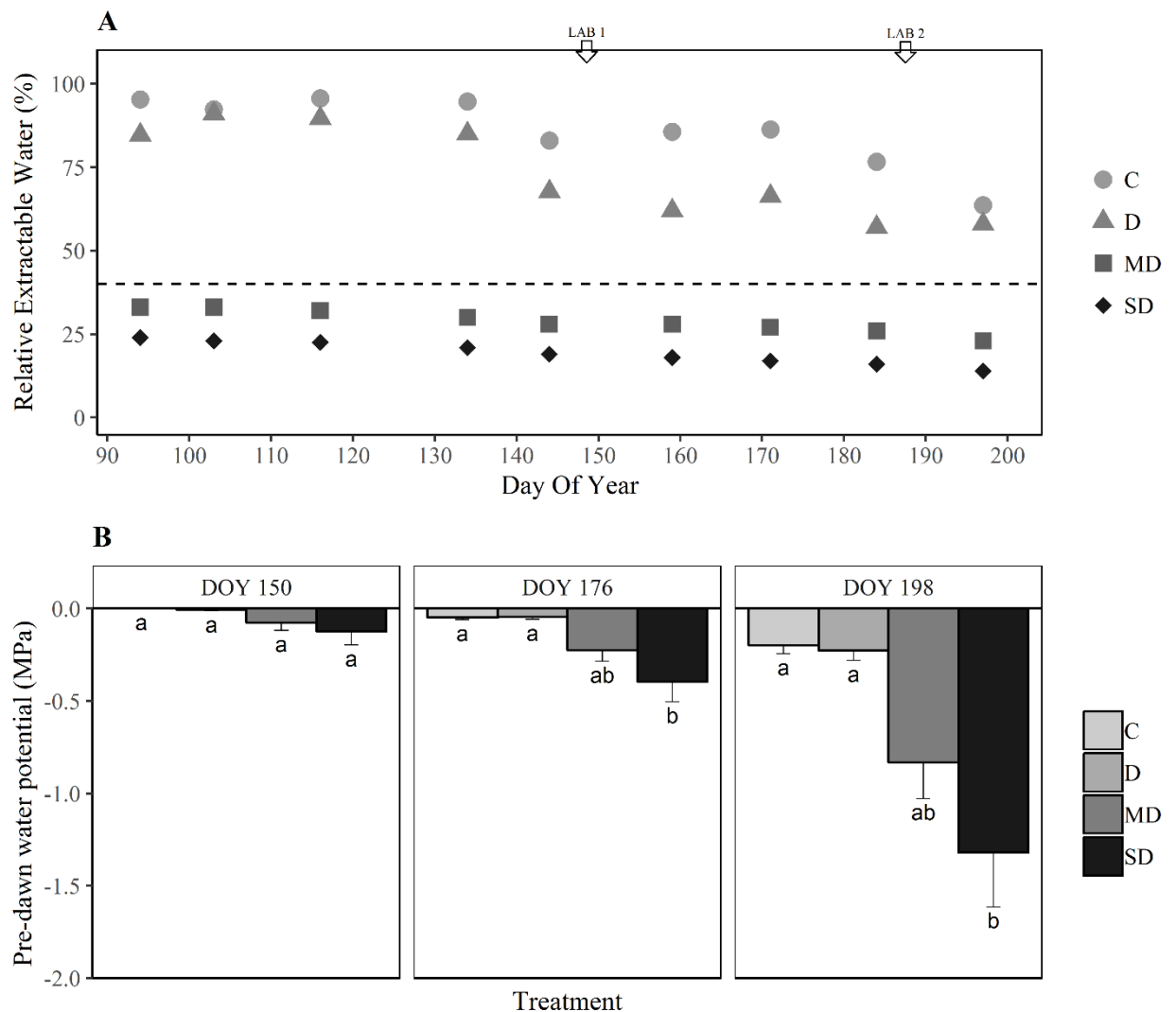


Figure VI.2. Seasonal dynamics for soil Relative Extractable Water (REW) during the growing season of 2015 (A) in 9-year-old beech trees, and average pre-dawn water potential for twigs at the time of the two labeling experiments (B) at days of year (DOY) 150, 176 and 198 in control (C), defoliation (D) and moderate (MD) and severe soil water deficit (SD) treatments. In A, grey arrows indicate the dates of the two labeling experiments (LAB1 and LAB2) and the dashed line indicates the threshold value of REW below which stomatal conductance is impacted, according to Granier et al., (1999). In B, different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) in pre-dawn twig water potential between treatments for a given date; mean, \pm SE; $n=24$.

The seasonal monitoring of the relative extractable water (REW) in the soil showed a progressive increase in the soil water deficit parallel to a continuous decrease of REW during the growing season in both drought treatments (MD and SD, **Figure VI.2.A**). In both MD and SD treatments, REW was below 0.4 for the duration of the experiment, whereas REW for the irrigated control (C) and defoliated (D) treatments remained above 0.4. As a result of the progressive seasonal soil water depletion, pre-dawn water potential (ψ_{pd}) in twigs decreased from -0.2 MPa (DOY 150) to -0.9 MPa for MD, and to -1.2 MPa for SD (DOY 198); ψ_{pd} always remained above -0.2MPa in C and D trees (**Figure VI.2.B**). Average pre-dawn twig water potential for the severe drought treatment (SD) was significantly lower ($p < 0.05$) than the values for the C and D treatments at DOY 176, and pre-dawn twig water potential in both the MD and SD treatments were lower than the C and D trees at DOY 198.

6.3.2. Leaf N concentrations and ^{15}N partitioning in leaf proteins after a 4-day chase period

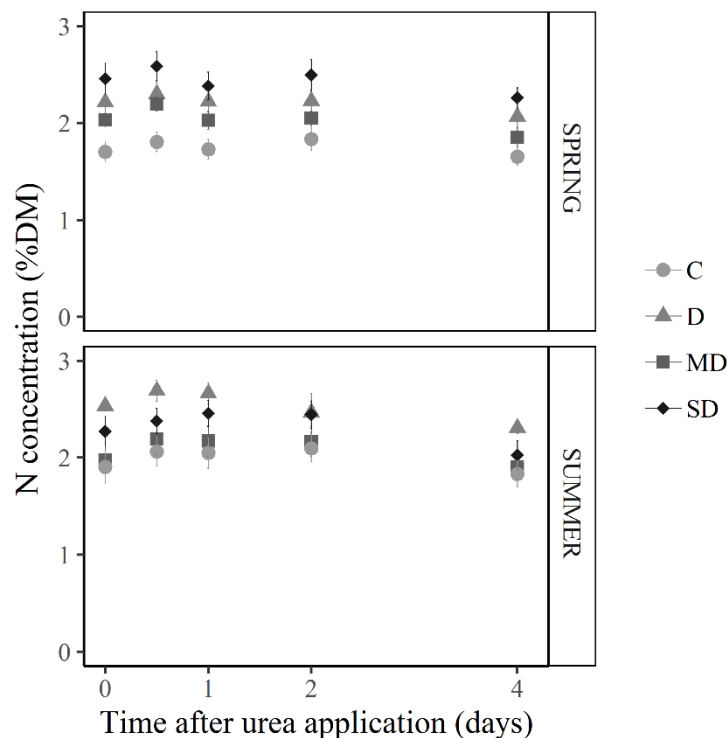


Figure VI.3. Nitrogen (N) concentrations (%DM) in leaves collected on the labeled branches of 9-year-old beech trees in spring (top) and summer (bottom) at days 0.5, 1, 2 and 4 after labeling in the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate (MD) and severe soil

water deficit (SD). In each season, a set of 12 trees per treatment was used and one branch per tree was labeled. Values are mean \pm SE, n=12.

Leaf N concentrations did not vary significantly before and after ^{15}N -urea labeling (**Figure VI.3**), with values comprised between 1.8 and 2.5 % DM. Thus, the application of ^{15}N -urea did not have any fertilizing effect. Regardless of treatment and season, ^{15}N concentrations in the leaves increased significantly with time until day 4, then stabilized (**Figure VI.4**). For a given treatment, ^{15}N concentrations in the leaves were not significantly influenced by season, with the exception of MD where ^{15}N concentrations during the chase period were significantly higher in summer than in spring.

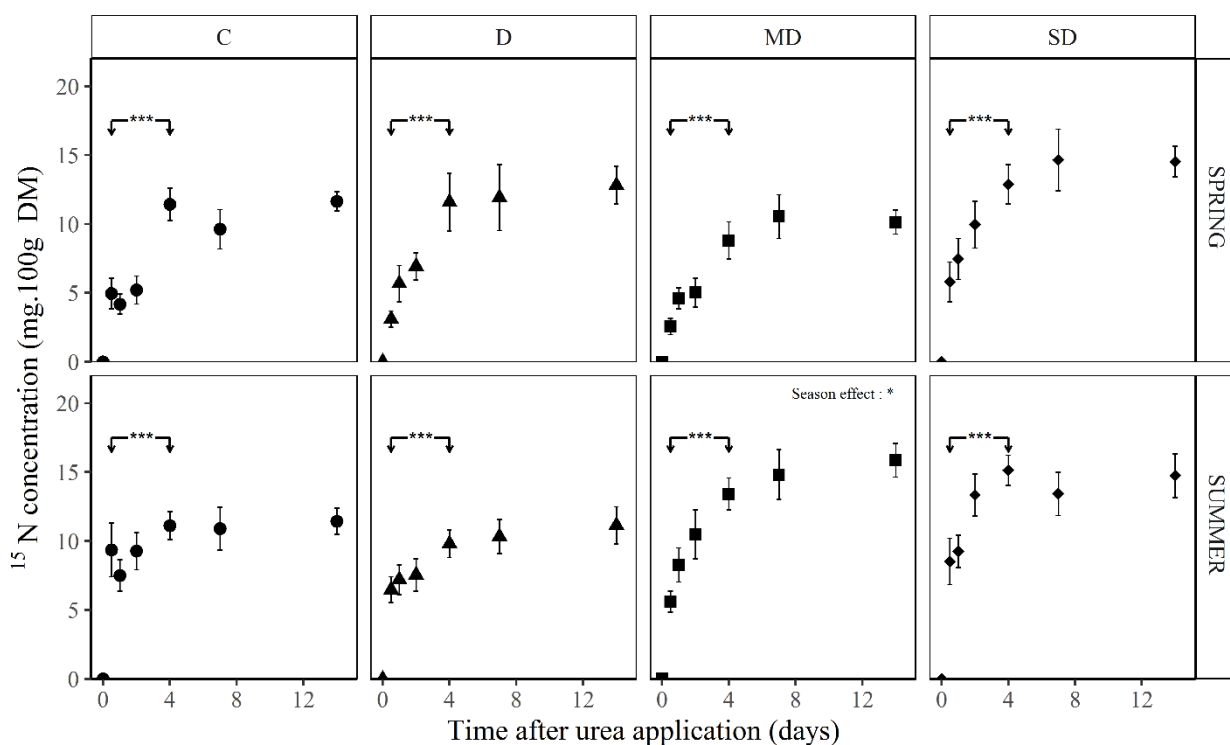


Figure VI.4. Dynamics of ^{15}N concentrations (mg.100g-1 DM) in leaves of 9-year-old beech trees in spring (top) and summer (bottom) for 14 days after labeling in the control (C, disc), defoliation (D, triangle), moderate (MD, square) and severe soil water deficit (SD, diamond) treatments. The same five leaves from each labeled branch were hole-punched at days 0.5, 1 and 2. Then, these leaves were harvested at day 4. Five new leaves were then chosen along the labeled branch and were hole-punched at day 7. At day 14, all the foliage remaining on the branch was harvested. The same protocol was applied for both seasons (spring and summer). The effect of time after urea application was calculated only when the same leaves

were used from day 0.5 to day 4 (ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). We tested the effect of season between spring and summer and significant differences were noted “season effect”. Values are mean \pm SE; $n=12$.

Total N and ^{15}N in leaf proteins were assessed 4 days after labeling (**Table VI.1**). There was a global effect of treatment on total leaf N ($p < 0.001$) and on total N in leaf proteins ($p < 0.001$) but no effect on the incorporation of ^{15}N into leaf proteins (**Table VI.1**). No seasonal effect was observed on total leaf N or total N in leaf proteins, whereas a significant seasonal effect ($p < 0.01$) was noted on ^{15}N in proteins and on ^{15}N partitioning ($p < 0.01$). In spring and summer, both total N concentrations and N concentrations in leaf proteins were higher in D and SD leaves than in C and MD leaves. N partitioning values indicated that most of the leaf N was invested in soluble proteins (60 to 68 % of total leaf N) without any significant treatment effect. After a 4-day chase period, the proteins were enriched in ^{15}N and there was no statistical difference among the ^{15}N concentrations in proteins in response to treatment or season, except for the MD trees where a slight seasonal effect was noted, with no season x treatment interaction (**Table VI.1**).

Table VI.1. Concentrations of total nitrogen (N) and ^{15}N in mature leaves, N and ^{15}N in leaf proteins and N or ^{15}N portioning (the part of protein concentration in total N or ^{15}N concentration) in 9-year-old beech trees 4 days after ^{15}N labeling. Labeling experiments were conducted in spring and summer for the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate soil water deficit (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate a significant difference between treatments for a given date ($p < 0.05$). “Season effect” is indicated by an asterisk if a significant difference was found between spring and summer. Values are mean \pm SE, $n=6$ except for C and D trees in summer where 1 value is missing, then $n=5$. Statistical values (represented as F and P values) of the season and treatment effect or the interaction between season and treatment are given for each variable.

Season	Treatment	N total (g.100g ⁻¹ DM)		N in proteins (g.100g ⁻¹ DM)		N partitioning (%)		15N total (mg.100g ⁻¹ DM)		15N in proteins (mg.100g ⁻¹ DM)		15N partitioning (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Spring	C	1.65	0.10 ^b	1.02	0.11 ^b	60.1	3.1	8.38	2.46 ^{ab}	2.74	1.06	37.5	5.5
	D	2.32	0.02 ^a	1.50	0.07 ^a	64.8	2.6	15.28	3.06 ^a	5.62	1.12	37.8	5.9
	MD	1.86	0.15 ^{ab}	1.10	0.06 ^b	59.7	2.6	7.79	1.55 ^b	2.24	0.45	30.1	3.1
	SD	2.30	0.15 ^a	1.48	0.05 ^a	65.7	3.6	10.68	2.09 ^{ab}	5.29	1.37	47.4	8.10
Summer	C	1.91	0.23	1.15	0.15 ^b	64.9	2.3	12.71	1.57	5.10	0.49	44.7	2.6 ^b
	D	2.39	0.05	1.55	0.07 ^a	63.3	2.2	10.08	2.22	6.85	2.01	73.1	10.9 ^{a*}
	MD	1.99	0.09	1.19	0.06 ^b	60.2	3.3	14.08	2.23	5.71	0.73 [*]	43.2	6.0 ^b
	SD	1.97	0.17	1.31	0.08 ^{ab}	68.1	5.1	14.63	1.47	5.48	0.97	41.1	10.0 ^b
Effect	F value	P value	F value	P value	F value	P value	F value	P value	F value	P value	F value	P value	
Season	0.011	0.916	0.455	0.504	1.321	0.258	1.852	0.181	9.850	0.003	8.211	0.010	
Treatment	6.674	0.001	16.15	<0.001	1.703	0.183	0.853	0.473	3.091	0.039	1.747	0.111	
Season * Treatment	2.017	0.128	2.095	0.117	0.210	0.888	3.210	0.033	1.148	0.348	3.239	0.057	

In spring, 30% to 47% of the total leaf ^{15}N was incorporated in leaf proteins, without any significant treatment effect. A global seasonal effect ($p < 0.01$) was noted, resulting in a general increase of ^{15}N partitioning in leaf proteins in summer, without any season x treatment interaction. In summer, interestingly, ^{15}N partitioning in the proteins of D leaves was significantly higher (73% of the total ^{15}N) than ^{15}N partitioning in the proteins of MD and SD leaves (43 and 41% of the total ^{15}N respectively).

6.3.3. Leaf and proximal branch N concentrations at the end of the chase period

Table VI.2. Concentrations of nitrogen (N, % DM) in leaves and twigs divided by annual growth unit (Y, Y-1 and <Y-1, where Y is year) in 9-year-old beech trees 14 days after ^{15}N labeling. Labeling experiments were conducted in spring and in summer for the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate soil water deficit (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate a significant difference between treatments for a given date ($p < 0.05$). Asterisks in summer indicate a significant difference between seasons for a given treatment. Values are mean \pm SE; $n=12$. Statistical values (represented as F and P values) for season and treatment effect and their interactions are given for each compartment.

Season	Treatment	Leaves		Twigs Y		Twigs Y-1		Twigs < Y-1	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Spring	C	1.66	0.10 ^c	0.86	0.03	0.41	0.03	0.46	0.03
	D	1.97	0.10 ^{ab}	0.85	0.05	0.51	0.02	0.45	0.06
	MD	1.81	0.09 ^{bc}	0.85	0.04	0.5	0.02	0.38	0.03
	SD	2.13	0.09 ^a	1.02	0.06	0.68	0.07	0.45	0.03
Summer	C	1.83	0.10 ^b	0.61	0.04 ^{a*}	0.44	0.06	0.37	0.05
	D	2.28	0.12 ^a	0.79	0.03 ^{ab}	0.56	0.03	0.4	0.03
	MD	1.86	0.10 ^b	0.81	0.05 ^{ab}	0.59	0.03	0.39	0.02
	SD	2.08	0.11 ^{ab}	0.98	0.08 ^b	0.67	0.06	0.44	0.04
Effect		F value	P value	F value	P value	F value	P value	F value	P value
Season		2.942	0.090	8.077	0.007	0.604	0.439	1.538	0.219
Treatment		8.721	<0.001	11.011	<0.001	9.987	<0.001	1.368	0.261
Season*Treatment		1.435	0.238	2.266	0.087	0.819	0.487	0.649	0.586

N concentrations in the leaves and twig samples 14 days after labeling are shown in **Table VI.2**. A strong treatment effect was noted in both leaves and Y twigs; there was no treatment effect in <Y-1 twigs. A seasonal effect was noted in Y twigs only. No season x treatment interaction was detected at $p < 0.05$. In spring, leaf N concentrations were influenced by the treatments with more N in SD and in D than in C. In summer, leaf N concentrations were higher in D than in C and MD. In both spring and summer, a significant SD treatment effect on N concentrations was found on both Y and Y-1 twigs compared to C, whereas an MD treatment effect was found only in summer on Y twigs. Overall, N concentrations in Y twigs in the C treatment were higher in spring than in summer. Both a seasonal and a treatment effect were found for Y twigs, whereas only a treatment effect was found on Y-1 twigs.

6.3.4. Biomass, N and ^{15}N allocation between leaves and proximal branches after a 14-day chase period

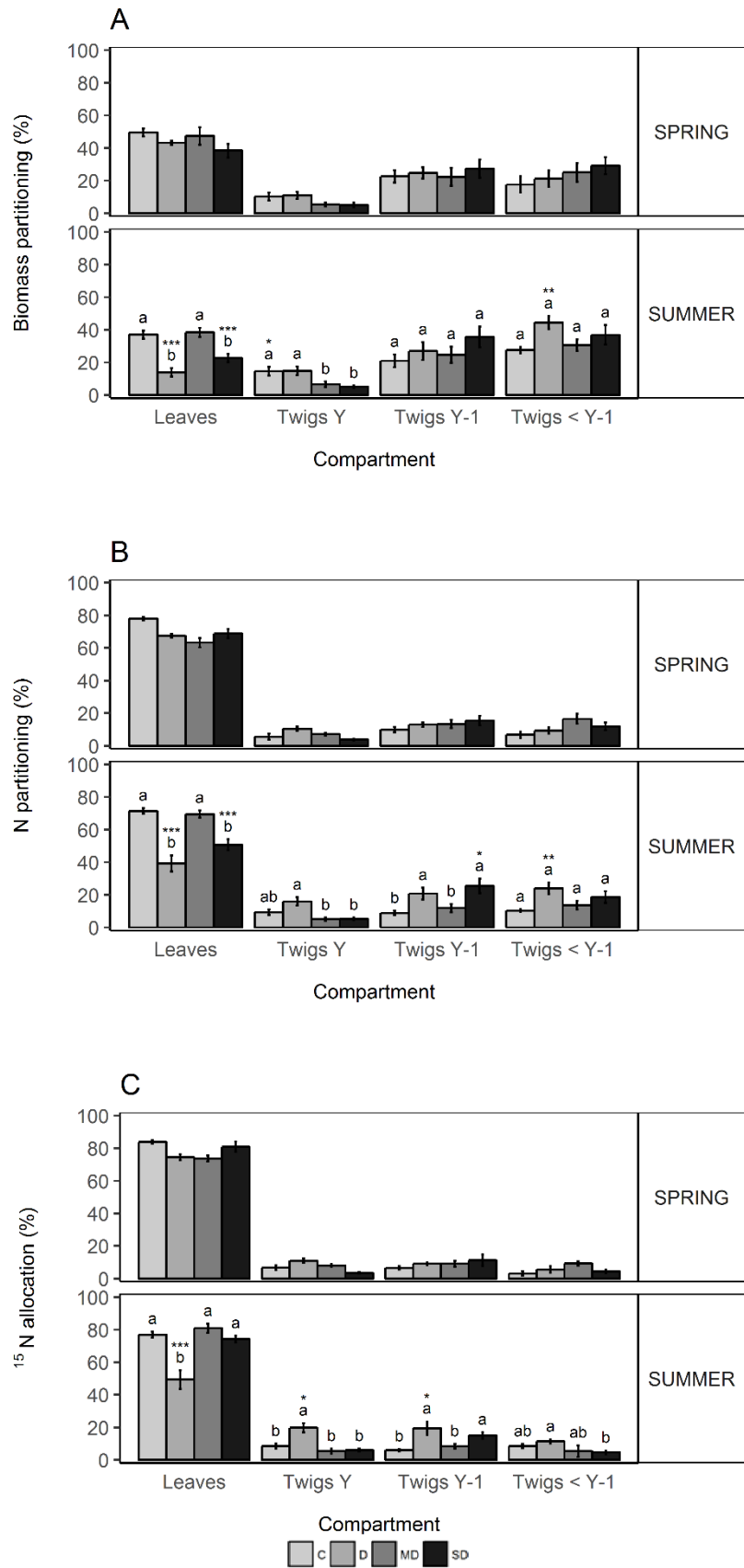


Figure VI.5. Biomass (A) nitrogen (B) and ¹⁵N (C) allocation (%) between leaves and twigs according to annual growth unit (Y, Y-1 and <Y-1, where Y is year) on 9-year-old beech trees

14 days after ¹⁵N labeling in spring and summer for the four treatments: Control (C), defoliation (D), moderate (MD) and severe soil water deficit (SD). Values are means ± SE; n=12. Treatment difference for a given compartment is shown with different letters (p < 0.05). Seasonal differences are shown with stars in the summer section (ns: p > 0.05, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

Table VI.3. Statistical values (F and P) for each variable given in Figure VI.5; biomass partitioning, nitrogen partitioning and ¹⁵N allocation for the effect of treatment, compartment (Cmpt) or the interactions between them (Treatment*Cmpt) in spring and summer.

Season	Effect	Biomass partitioning		Nitrogen partitioning		¹⁵ N allocation	
		F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}	F _{value}	P _{value}
Spring	Treatment	1.0963	0.3610	1.2320	0.3097	1.3742	0.2638
	Cmpt	88.8318	<0.001	500.4165	<0.001	649.6055	<0.001
	Treatment*Cmpt	1.7464	0.0865	2.1432	0.0316	1.8090	0.0746
Summer	Treatment	2.0092	0.1269	2.573	0.0664	5.286	0.0035
	Cmpt	46.8348	<0.0001	232.394	<0.001	489.262	<0.001
	Treatment*Cmpt	8.0710	<0.0001	13.298	<0.001	14.711	<0.001

There was no treatment effect on biomass partitioning, but a compartment effect was observed, with a treatment interaction in summer (**Figure VI.3**). In spring, there was no significant effect of treatment on biomass partitioning and leaves accounted for the highest biomass (more than 40%, **Figure VI.5.A**). In summer, C and D trees had higher Y twig biomass partitioning than MD and SD whereas leaf partitioning was higher in MD and C than in D and SD. A seasonal effect was found on SD tree leaves with higher partitioning in spring than in summer; D trees also displayed a significant seasonal effect on leaves and <Y-1 twigs.

There was no treatment effect on N partitioning, but a significant treatment x compartment interaction was noted, especially in summer (**Figure VI.5.B**). A markedly significant compartment effect was noted on ^{15}N partitioning (**Figure VI.5.C**). Treatment significantly impacted ^{15}N partitioning in summer with both a compartment effect and a compartment x treatment interaction. No significant treatment difference was found in spring on N (**Figure VI.5.B**) or ^{15}N (**Figure VI.5.C**) partitioning. As a consequence of defoliation, D trees showed a significant reduction in N and ^{15}N partitioning in leaves and Y twigs in summer compared to other treatments, though there was also a seasonal reduction compared to spring. SD trees had less N and ^{15}N partitioning in Y-1 twigs in summer compared to C and MD.

6.3.5. ^{15}N long-distance transport

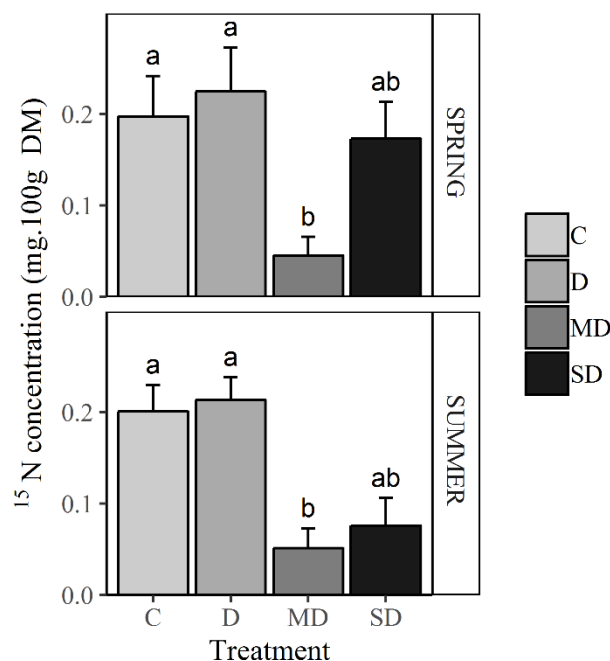


Figure VI.6. Long-distance transport of ^{15}N (mg.100g^{-1} DM) from the leaves of labeled branches to the leaves of the apical terminal twigs on 9-year-old beech trees 14 days after

labeling in spring (top) and summer (bottom) for the four treatments: control (C), defoliation (D) and moderate (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for a given date; values are mean \pm SE; $n=12$.

At the end of the chase period, the leaves sampled from the apical terminal twig showed a significant ^{15}N enrichment in all treatments regardless of season (**Figure VI.6**). However, this ^{15}N enrichment was lower in the MD leaves than in leaves from the other treatments ($p < 0.05$). A decreased rate of ^{15}N enrichment was observed from spring to summer for SD leaves but was not significant at $p < 0.05$.

6.4. Discussion

6.4.1. Use of a ^{15}N urea pulse to trace the N pool in leaves

Our experiment was conducted at two dates during the growing season: in spring (DOY: 148) and in summer (DOY: 187) and in both cases, we applied ^{15}N urea to mature leaves of beech trees to label the whole leaf N pool of a given branch. ^{15}N urea was historically used on fruit trees (Klein and Weinbaum, 1984; Rosecrance *et al.*, 1998) to study the impact of foliar N fertilization on fruit production. Recently, this approach has been successfully used to study the effect of foliar N fertilization on forest tree nutrition at young stages (Uscola *et al.*, 2014). In older forest trees, ^{15}N urea labeling, without any fertilizing effect, has also been used to study N translocation between below- and above-ground components in 9-year-old beech trees (Zeller *et al.*, 1998), though the method is rarely used in large trees for obvious practical reasons. In our ^{15}N experiment, our first concern was to avoid any significant increase in leaf N content due to the foliar labeling. We therefore used a small amount of highly ^{15}N -enriched urea. For each treatment and each date, our results show that the N concentration in the leaves was similar before and after labeling, and was typical of N concentrations found by El Zein *et al.*, (2011) in adult leaves of beech trees located near our experimental site.

6.4.2. Leaf N metabolism

A well-established relationship exists between photosynthetic capacity and leaf nitrogen content in plants (Field and Mooney, 1986). High N partitioning to leaves is essential for leaf metabolism and provides N to the photosynthetic machinery during the growing season (Evans and Seemann, 1989), since a large proportion of the plant's N is present in thylakoid membranes and in soluble proteins of the Calvin cycle that represent most of the leaf's nitrogen. Leaf metabolism displays differences between spring and summer (Millard and Proe, 1991; Gomez and Faurobert, 2002). Under non-limiting environmental conditions, these metabolic differences may be due to local meteorological conditions which vary with the seasons, but also to seasonal variations in tree growth, which induce seasonal variations in the source-sink balance. In fact, in beech, the initiation of radial growth and the reactivation of the cambium are mainly dependent on climatic variations and leaf photosynthesis. In addition, a negative correlation of beech growth with maximal temperatures in summer has been found (Cufar *et al.*, 2008, Michelot *et al.*, 2012). Consequently, both seasonal climatic changes and growth

changes in sink organs will affect the N metabolism of leaves, the source of carbohydrates fueling several metabolisms e.g. primary growth, transport, etc. (Peñuelas *et al.*, 2013). However, in our study we did not detect any significant effect of season on N concentrations in leaves or on ¹⁵N incorporation in leaf proteins in non-stressed trees. This result led us to hypothesize that seasonal adjustments in beech tree photosynthesis in spring and summer, with leaf protein synthesis remaining quite stable, could be due to changes in activity more than to changes in the synthesis *per se* of soluble proteins of Calvin cycle.

6.4.3. Leaf N functioning under harsh stress

Defoliation causes an immediate loss of resources (C, N) and a reduction in photosynthetic surface area for the tree (Lovett *et al.*, 2002); this may affect leaf biochemistry and N assimilation in the remaining leaves, especially in June when up to 30% of total beech N is found in the leaves (El Zein *et al.*, 2011b). First, a higher leaf N content than in controls was effectively observed in spring 2015 in the leaves of our beech trees which had been submitted to severe defoliation the previous year (2014). Despite the loss of N and carbon created by the previous summer's defoliation, and the likely detrimental consequences for storage during the winter, more N was allocated to the new foliage produced the following spring in the defoliated trees. Then, in 2015, the beech trees defoliated in 2014 were submitted to a second defoliation. At the branch level, 75% of the leaves were removed in spring 2016, resulting in a loss of $0.07\text{g} \pm 0.01$ of N for the branch (results not shown), i.e. a loss of about 75% of the N initially present in the branch foliage. This should have caused a huge and immediate N constraint for the tree. However, one month after this summer defoliation, leaf N was still higher than in the controls. The ¹⁵N tracer showed that more N was allocated to protein synthesis in the leaves of the defoliated trees. Such results suggest that compensatory processes exist in beech trees, enabling them to mitigate the negative effects of a past or current defoliation by allocating the needed N resources to the remaining leaves from other tree compartments to maintain photosynthetic capacity. In fact, changes in allocation of internal resources among organs are often observed in plants responding to defoliation. For example, an increased allocation of resources to leaves at the expense of root and stem growth have been found in grasses and in aspen trees (Macaduff *et al.*, 1989, Stevens *et al.*, 2008). In our study, secondary growth also decreased by 15 to 20% in the defoliated beech trees (unpublished data). The higher leaf N content we found in the defoliated trees could be due to extra N uptake by the roots. However, more probably, this additional N was remobilized from the N reserves located in perennial compartments with

woody tissue (i.e. root and trunk sapwood), which are known to be the main pools for stored N in deciduous tree species (Nielsen *et al.*, 1997, Millard and Grelet, 2010). Because defoliation changes the within-tree microclimate, notably providing better access to sunlight for the remaining foliage, a capacity to compensate for the loss of leaves with higher photosynthetic rates has been observed in both deciduous and evergreen species (Quentin *et al.*, 2011, Puri *et al.*, 2015). This increase in light availability has also been reported to cause an increase in leaf N and changes in leaf protein composition in sugar maple (Ellsworth and Reich, 1995). Our study also showed that leaves of D trees contained more proteins than control leaves. This increase in the protein pool in beech leaves could be due to an extra accumulation of soluble proteins, which could enhance photosynthetic capacity and also be a temporary N storage strategy. For instance, the Rubisco protein is a carboxylase known to be stored when in excess and to function as a vegetative storage protein (Millard, 1988, Dickson, 1989, Warren *et al.*, 2001). In response to the 2nd defoliation, the proportion of ¹⁵N allocated to foliar proteins increased from 38% in spring to 73% in summer whereas this seasonal increase was less important in the C trees (+28%); this suggests rapid changes in leaf biochemistry for the D trees. Consequently, despite the N loss created by this new defoliation, the leaves of the defoliated trees accumulated more N than the controls and exhibited an important *de novo* protein synthesis. Such metabolic changes probably involve tree stores that play a buffer role in adjusting tree N requirements and may enhance tolerance for partial, repeated foliage loss; this has been also suggested in other studies on deciduous and evergreen species (Palacio *et al.*, 2012, Piper and Fajardo, 2014).

Prolonged drought stress in forest trees may induce a series of changes in the biochemical processes of photosynthesis and cause a decrease in photosynthetic capacity and a decline in leaf nitrogen content (Grassi *et al.*, 2005). In our study, both a moderate and a severe water stress were applied to beech trees for two successive growing seasons. Under severe water-stress, we observed that for a given leaf area, C assimilation in 2015 decreased from 10.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in the leaves of the control treatment to 2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in the SD treatment (Daniel Epron, personal communication). Beech is known for its sensitivity to drought, and in beech saplings, when a severe soil water deficit occurred, a decrease in photosynthetic performance was observed, notably through a loss of chlorophyll (Gallé and Feller, 2007). Stomatal and mesophyll limitations to CO₂ diffusion under moderate and severe drought affect the carboxylase activity of Rubisco (Grassi and Magnani, 2005) in reason of a low chloroplastic CO₂ concentration. A decline in both the activity and amount of Rubisco and an increase in amino acid pools known to play a role in tissue osmoprotection may also occur (Bode *et al.*,

1985; Fotelli *et al.*, 2002). In our study, we did not see any decline in leaf N concentrations in beech trees in response to a prolonged severe water stress, and ^{15}N was still incorporated into the leaf proteins. Such a result suggests that a high metabolic activity was maintained with both rapid catabolism of the absorbed urea and rapid anabolism into amino acids and proteins. Our results also show that the ^{15}N incorporation into the soluble protein pool in summer represented only 40% of the ^{15}N present in the leaves of the SD trees, meaning that about 60% of the ^{15}N was incorporated into N compounds other than proteins (possibly pigments or amino acids) at this period of intense metabolism for leaves. Glutamine or allantoin, two important amino acids for transport (Sauter and Van Cleve, 1992), could be involved, as could proline and asparagine, osmoprotectants which maintain cell integrity under limiting soil water conditions (Bode *et al.*, 1985, Fotelli *et al.*, 2002).

6.4.4. Impact of stress on short- and long-distance transport of leaf N

We studied how much leaf N metabolism and its transport out of the leaves would be disrupted by repeated abiotic stress (recurrent defoliation or prolonged soil water deficit) at two key growth stages for both primary and secondary growth. Through nutrient storage and remobilization processes, trees ensure their survival by limiting their dependency on mineral uptake during adverse environmental events like drought (Rennenberg *et al.*, 2006). N is one of the nutrients that can be transported in the phloem or xylem and continuously recycled within the tree (Grassi *et al.*, 2003), or be released in tiny amounts *via* soil rhyzo-deposition, as Sommer *et al.*, (2016) shown in beech. We applied ^{15}N -urea on mature leaves in spring and summer and estimated whether part of the ^{15}N pool was transported out of the leaves towards the bearing branch or beyond, or whether it stayed in the leaves and was recycled there. In the well-watered trees, the maximum level of ^{15}N incorporated inside the N leaf pool was obtained after a 4-day chase period and stabilized for the next ten days. It is likely that this stabilization was due to an important local turnover in the N pool within the leaves rather than to an intensive ^{15}N export to and unlabeled N import from other tree compartments. Indeed, 14 days after labeling, about 80% of the ^{15}N content found in the whole branch had remained within the leaves, and only 20% had been distributed along the twigs on the same branch. For the duration of our experiment and regardless of treatment or season, this ^{15}N distribution pattern between leaves and branch twigs remained unchanged. However, in summer, the ^{15}N allocation inside the branch was modified due to the drastic defoliation the tree had undergone one month before.

This defoliation caused a biomass imbalance between the remaining leaves and the bearing branch, and a higher ^{15}N allocation in twigs Y and Y-1 occurred at the expense of the leaves. We also sampled the leaves of the apical terminal twig on each tree and found that some of the ^{15}N incorporated in the leaf N pool had been transported over a long distance to the terminal twig. It is very probable that the N exported from the leaves was evenly distributed within the crown, though this was beyond the scope of our investigation. Our study showed that, even under severe drought, beech maintained long-distance transport of N from labeled leaves. The persistence of long-distance N transport from the leaves after two years of no irrigation was truly remarkable. However, the increase in drought intensity between spring and summer induced a decrease in the ^{15}N flux towards the leaves of the terminal twigs of trees. This indicates a decrease in N transport capacity from the labeled branch in the SD trees. Even though N metabolism at the leaf and branch scales was apparently unaltered by two years of drought, the lack of water and N uptake did also cause a change in leaf N transport inside the tree. Two possible complementary causes could be involved in severe water-stressed beech trees: (1) the necessity for the leafy branches to keep more of their N and to favor local recycling to the detriment of its export due to the unavailability of N from soil absorption, or/and (2) the appearance of a partial dysfunction of the hydraulic system, particularly in the phloem, as proposed by Dannoura *et al.*, (2018) which could alter long-distance N transport.

6.5. Conclusion

Even under extreme constraints, leaf N metabolism was maintained, possibly thanks to internal N recycling and transport within the tree. Such strategies would help trees to avoid nitrogen starvation and to cope with the recurrent drought stress predicted in the context of future climate change.

CHAPITRE 7:

Article 3: SEASONAL TRANSLOCATION OF FOLIAR NITROGEN WITHIN BEECH TREES AND ITS TOLERANCE TO STRESS: A ¹⁵N LABELING APPROACH (in preparation)

7. SEASONAL TRANSLOCATION OF FOLIAR NITROGEN WITHIN BEECH TREES AND ITS TOLERANCE TO STRESS: A ¹⁵N LABELING APPROACH

CHUSTE P.A.¹, MASSONNET C.¹ and MAILLARD P.^{1*}

¹UMR 1434 SILVA, INRA, Université de Lorraine, Agroparistech, 54280 Champenoux,
France

Running title: Seasonal distribution of leaf nitrogen under stress in beech trees

Corresponding author: pascale.maillard@inra.fr

ABSTRACT

According to current scenarios for climate change in France, extreme drought events are expected to occur more frequently. Such events will not only limit supply of water but also the availability of soil N for trees. Nitrogen is one of the main nutrient driving growth and productivity in many forests. One question that need to be addressed is how severe drought events affect the internal N cycle and the growth of a widespread deciduous forest tree species as beech (*Fagus Sylvatica* L.). We designed an experiment with young beech trees (*Fagus Sylvatica* L.) submitted to an artificial N shortage through a rainfall exclusion or partial defoliation. Both treatments were expected to drastically affect the N balance of the trees by decreasing access to water and nutrients in the soil or through a loss of leaf N. To follow the changes of within tree N fluxes and N uses in response to the treatments, we pulverized a low quantity of urea with a high ^{15}N enrichment on the whole foliage of these trees thus tracing the flux of leaf N into other organs of the trees during autumn and winter and their remobilization for new growth in Spring. We aimed to test the following hypotheses: (1) drought and defoliation stress will alter N (^{15}N) dynamics (2) which tree compartment will be preferentially used to store N (^{15}N) during the winter (3) how the treatments will alter the use of N (^{15}N) for the new growth in Spring? The first results show that nitrogen cycling have already started when we cut trees in October, 2 weeks after the labelling. Less ^{15}N was found in leaves compared to woody organs (e.g : stem and branches). We also found that nitrogen recycling was not modified by severe constraints where branches served as major target organs. In following spring, leaves were still a major sink for N remobilisation despite less stored N found in perennial parts. A result like this could mean that leaf metabolism is maintained even under severe constraints which can be advantageous in case of better soil water conditions.

Keywords: Nitrogen, labelling, defoliation, soil water deficit, *F. Sylvatica* L.

7.1. Introduction

From fifty years, drought periods and heat waves have increased worldwide as a consequence of global climate change and this trend is expected to increase in the coming decades (Coumou *et al.*, 2013, Wagner *et al.*, 2013, IPCC, 2013). These climate hazards can induce strong reductions of primary productivity (Piovesan *et al.*, 2008) and sometimes forest decline and tree mortality. Understanding of the physiological processes involved in tree dysfunctions and forest tree decline is a major concern (Bréda *et al.*, 2006, McDowell *et al.*, 2008, Sala *et al.*, 2010). Two main but non-exclusive physiological mechanisms have been proposed: hydraulic failure and carbon starvation (McDowell *et al.*, 2008, Sala *et al.*, 2012, Hartmann *et al.*, 2013). On one side, hydraulic failure may lead to mortality when partial or total loss of xylem function occurs in response to drought. On the other side, a carbon starvation is also possible when drought lasts long enough to create a carbon imbalance between sink demand and source supplies (photosynthesized or remobilized carbon). Besides these two hypothesis, some authors have recently suggested that a reduced nutrient availability in response to drought, especially nitrogen (N) which could play also an important role in tree dysfunction (Gessler *et al.*, 2016). However experimental evidence of how N cycling of adult forest trees could be modified by harsh conditions is still missing today. Available studies focused only on seedlings but these results are difficult to generalize if ontogeny have an impact on tree N balance, as noticed on C balance (Cavender and Bazzaz, 2000, Gilson *et al.*, 2014). Forest ecosystems have often developed on poor soils which were not convenient for optimal growth due to the low N availability (Raven and Andrews, 2010). To cope with this N deficiency, trees adopted dedicated strategy by optimizing N use efficiency and internal recycling (Vitousek, 1982). The internal N cycling consists in N storage in perennial structures (wood and roots) when N requirements are low and remobilization of these N reserves towards sinks (mainly the foliage) in case of N shortage when current demand exceeds root N absorption capacity due to the seasonality of plant growth (Chapin *et al.*, 1990). In fact, in early spring, N uptake by roots is not sufficient to sustain spring growth and trees rely on stored N as largely demonstrated on fruit trees (O'Kenney, 1975, Millard and Nielsen, 1989, Nielsen *et al.*, 1997, Tagliavini *et al.*, 1998, Cheng *et al.*, 2002, Dong *et al.*, 2002) and more recently on mature forest trees (El Zein *et al.*, a & b 2011, Valenzuela Nunes *et al.*, 2011, Bazot *et al.*, 2013). This net decrease of stored N observed in spring cannot be recovered fastly and so, during the vegetative season, trees rely mainly on N soil uptake by roots (Bazot *et al.*, 2013, Villar-Salvador *et al.*, 2015). In autumn, a mechanism called N resorption occurs and consists in the degradation of foliar proteins into

amino acids and the transport via the phloem towards bark and wood parenchyma where they are stored during winter under amino acids and vegetative storage proteins forms (Sauter *et al.*, 1989, Wetzel *et al.*, 1989, Stepien *et al.*, 1994, Millard, 1996). Mobilization and refilling of N stores lead to seasonal fluctuations in these storage pools. As N soil is often a growth-limiting factor in natural forest ecosystems (Rennenberg *et al.*, 1998) and the ability of trees to store and redistribute N resources internally is a fundamental process conditioning their survival. A limited soil N availability caused by a stress like drought will end to an inability of roots to explore the soil and to a decrease of microbial activity (Kreuzwieser and Gessler, 2010, Creeger *et al.*, 2014), increasing the risk that N uptake will not be sufficient enough to refill tree internal reserves. Consequently, Gessler *et al.*, (2016) hypothesized that the internal N cycling, could become critical for tree survival when drought occurs in early spring and summer especially in deciduous tree species.

In relation to the Gessler's hypothesis previously presented (2016), we explore in our study how the tree internal N cycle is modified by a prolonged drought or a yearly manual defoliation in eight-year-old beech trees submitted to two years of constraints. As mentioned above, a soil water deficit is expected to decrease both N soil availability and uptake by trees. In another way, any drastic defoliation may cause a harsh loss of N in trees because thirty-eight percent of N are located in leaves in June on beech trees (El Zein, 2011). So by these two severe constraints, we expect to decrease the tree N availability leading to adjustments on internal tree N metabolism to maintain fundamental tree functions (growth, maintenance and storage). To follow these adjustments, we labeled the whole foliage of control, defoliated and water stressed beech trees with ^{15}N -urea before leaf senescence in autumn. Then, we followed the fate of ^{15}N from senescing leaves toward perennial organs in the whole tree during the winter storage, and then its remobilization for spring growth.

We chose to work on European beech trees (*Fagus sylvatica* L.) trees, one of the most widespread and abundant species in Europe, because it is known to be more drought sensitive than other European broad-leaves species (Zang *et al.*, 2014; Zimmermann *et al.*, 2015) but paradoxaly it is also one of the most resistant to mortality. Given its survival capacity, we hypothesized that its resources management is particular efficient to face to constrains. Various authors also emphasize the remarkable potential for recovery after drought stress of *Fagus sylvatica* (Elling *et al.*, 2007). In the present study, we made the following hypotheses: (1) drought and defoliation applied repeatedly for two years will create a significant decrease of the tree N pool; (2) due to this N reduction, the stressed tree will intensify its leaf N recycling

and export more N in autumn toward perennial organs compared to a control tree in an attempt to counterbalance a marked decrease in total N winter storage level. (3) The expected N storage decrease in the stressed trees will impact the level of remobilized N available for growth increment and canopy establishment in spring. (4) Finally, if the N remobilization is source driven (Millard and Grelet, 2010), a reduced growth without any changes in N mobilization intensity and its partitioning between perennial organs and new formed organs (twigs, leaves) will be expected in stressed trees compared to controls.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Experimental design and growth conditions

The study was conducted on European beech trees. In 2006, beech seeds were collected in several forests in the Lorraine region of France and sown in 2007 in biodegradable horticultural pots made of wood fiber and filled with a peat and sand mixture. The seedlings were grown for one year in a nursery (INRA Grand-Est Nancy, France). In 2008, about 1000 of the seedlings were transplanted and grown for 7 more years in open ground at the INRA Grand-Est nursery (Champenoux, France, 48°75'N, 6°34'E, 229m asl). In 2014, a rain exclusion system was built above the 8-year-old trees: a semi-rigid structure supporting a transparent roof built with polycarbonate sheets and nets installed around the roof to intercept lateral rain. The trees under the roof were subjected to four different treatments for two years (2014, 2015): (1) control (C) in which the trees were regularly irrigated; (2) defoliation (D) in which the trees were submitted to a yearly defoliation and regularly irrigated: manual defoliation of the trees in treatment D was done each year in June (**Figure VII.1.A**); 75% of the total foliage was removed and the removal was homogeneously distributed throughout the tree crown; (3) moderate drought (MD) and (4) severe drought (SD), where the trees were submitted to two levels of soil water deficit. The soil in the drought treatments was isolated by a rigid waterproof plastic sheet 1.80 meters depth buried vertically around the area. The two drought stress levels were not designed to realistically simulate a climate change scenario, but rather to create drought conditions that were so unfavorable that they would likely cause beech tree dysfunction and mortality. In fact, lateral rain entering under the roof created some variability in soil water status in the drought treatment at the time of labeling and this allowed us to select trees with contrasting levels of water stress. The hydraulic status of the chosen trees for the experiment in each treatment (8 trees in C and D, 5 in MD and SD in September 2015 and 6 trees in C and D, 3 in MD and SD in June 2016) was checked by measuring pre-dawn water potential in twigs (ψ_{pd}) in September 2015 and in June 2016. We sampled the twigs (one per tree) before sunrise and performed the ψ_{pd} measurement with a pressure chamber (PMS Instruments, Albany, OR, USA).

7.2.2. Soil characteristics and soil water content measurements

The studied site was characterized by 60cm-deep homogenous soil with an average texture (Silt: $61 \pm 1.28\%$; Clay: $27 \pm 0.98\%$; Sand: $12 \pm 0.66\%$), a pH comprised between 7.5 and 8, an organic matter content between 12.1 and 14.9 g.kg⁻¹ (E Silva, 2010) and a total N comprised

between 0.54 to 0.87 g.kg⁻¹. Below 60cm, the grey marl of the Jurassic inferior (Lotharingian) era was characterized by a swelling heavy clay soil with a relatively high bulk density.

We used neutron probes (TROXLER TX 4301, Research Triangle Park, NC, USA) to measure the volumetric water content of the soil. Three neutron probe access tubes (aluminum, closed at their base) were installed in each of the four treatment areas in order to quantify water content at different depths: two ranged from 0-1m in depth and one ranged from 0-1.6m. During the growing season, measurements were carried out every two weeks. Counts were logged every 10 cm for the upper 100 cm, and every 20cm below that.

For each depth *i* (thickness *t_i*), Total Available Water soil Content (TAWC in mm) was calculated by estimating the characteristic points from pedotransfer classes for gravimetric soil moisture at field capacity (θ_{fc}) and gravimetric soil moisture at wilting point (θ_{wp}). The characteristic points were checked and adjusted with probe measurements, during winter for volumetric soil moisture at field capacity and during summer for volumetric soil moisture at wilting point. Soil bulk density was assessed with the cylinder method. Relative Extractable soil Water (REW in %) was calculated according to Bréda *et al.*, (1995) as follows:

$$REW=100* \frac{TAWC-R}{TAWC} \quad (19)$$

where R is the actual volumetric soil water content in mm, and total soil extractable water content down to 1.60m is estimated to 310 mm.

The soil in the C and D treatments was irrigated regularly throughout the experiment with an automatic drip watering system which delivered between two and four liters per tree two to three times a week. We adjusted the amount of the water according to the REW measurements in order to avoid any water shortage (REW >0.4), with 40% of the REW corresponding to the critical threshold where trees start to avoid water loss by closing their stomata (Granier *et al.*, 1999).

7.2.3. Foliar ¹⁵N labeling procedure

The labeling experiment was performed at end of September 2015 (DOY: 271), before leaf fall. The timing of labeling is summarized in **Figure VII.1**. Forty-four trees were randomly chosen for labeling. On each tree, a crown bag made of polyethylene was placed over the total foliage of the tree to isolate it from its local environment. In the late afternoon, an aqueous solution of ¹⁵N urea was sprayed inside the bag onto the leaves with a hand sprayer (Zeller *et al.*, 1998).

The urea solution (10.4 atom%, 5.0 g.L⁻¹) was sprayed in a fine mist, which limited the formation of drops and ensured a homogeneous labeling of the leaves. After the labeling, the plastic bag was kept on all night, then very carefully removed the next morning to avoid any contamination among trees. A net was put all around the tree to collect all the litter from the labeling through the winter fall.

7.2.4. Sampling protocol

Green leaves were sampled in July 2015 2 months prior the labeling to measure the leaf N concentration in the control, defoliated and water stressed trees (n=12 in each treatment). In October 2015, one month after the labeling, we harvested 8 trees (2 trees per treatment) in view to assess the incorporation of ¹⁵N in the internal N cycle and its presence in perennial storage organs. Then, trees were harvested at two key phenological dates (El Zein, 2011) after the labeling: 1) in February 2016, 5 months after labeling at the theoretical highest storage level of N in perennial organs; and 2) in June 2016, 9 months after labeling at the theoretical end of N remobilization, once leaf expansion was done. We harvested 18 trees in February and June (6 C; 6 D; 3 SD; 3 MD), i.e. a total of 44 trees were labeled and harvested during this experiment. Ten unlabeled trees (3 C; 3 D; 2 MD; 2 SD) were also harvested in October 2015 to assess the natural abundance of ¹⁵N in each tree compartment. Each tree was separated in its compartments (leaves, branches, trunk and roots). Roots were separated according to their diameter: fine roots (d<1mm), lateral roots (1<d<3mm) and main roots (d>3mm). We collected the litter in February 2016 with use of litter net. Each compartment was weighted to get the fresh mass, immediately frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C. Then compartments were freeze-dried (Dura-Top^(r), Dura-Dry^(r), FTS Systems^(r), Stone Ridge, NY, USA), weighed to determine the dry matter (DM) and ground into a fine powder with a ball mill (CEPI SODEMI CB2200, Cergy, France). The timing of labeling and harvest is displayed in **Figure VII.1**.

7.2.5. Growth measurements

For each treatment, height and diameter of labelled trees were measured at the end of the vegetative season in 2015 with an electronic caliper and a beam, respectively. In June 2016, the spring primary growth (trunk and shoots) was estimated on the sampled trees by measuring the length of the shoot 2016 on both on the trunk (primary axis) and of three branches per tree (secondary axis) randomly chosen in the canopy of each tree.

7.2.6. Foliar variable measurements

In October 2015, several foliar characteristics were assessed by sampling randomly 100 leaves per tree on the 8 labelled and 10 additional unlabeled trees (6 C; 6 D; 3 MD; 3 SD). The individual leaf area of these 100 leaves was measured using a portable area meter (LI 3000 A, LI-COR, Lincoln Nebraska, USA) then dried 48h at 100°C and weighed. The mean individual leaf area, the leaf mass per area (LMA), the total number of leaves and the total leaf area of trees were calculated based on the relationship between the leaf biomass and the leaf area. These measurements were also repeated on the 18 labeled trees harvested in June 2016 once leaf expansion was achieved. In order to have the effect of the defoliation made the year before on the current vegetative season leaf expansion, we calculated the initial values (number of leaves, LMA and total leaf area) for defoliated trees in 2015 by multiplying found values of harvested trees in October 2015 by 75% (e.g the intensity of defoliation made in 2015).

7.2.7. Nutrient resorption efficiency

Nutrient resorption efficiency was calculated as described by Killingbeck (1996) and more recently by Hai-Yang *et al.*, (2018)

$$\text{NuR} = \frac{(\text{Xgr} - \text{Xsen}) * \text{MLCF}}{\text{Xgr}} * 100\% \quad (20)$$

Where Xgr and Xsen are the N concentrations of green (taken in July) and senescent leaves (taken in February) respectively. MLCF correspond to the mass loss correction factor corresponding to the percentage of leaf mass remaining in senesced leaves comparing to the green leaves (Vergutz *et al.*, 2012). As our specie is a deciduous temperate species, we used an MLCF value of 0.784 as preconized in Vergutz *et al.*, (2012).

7.2.8. Elementary and isotopic analyses

Total N concentration (% of dry matter) and ¹⁵N isotopic abundance (atom%) of the different tree compartments (leaves, branches, trunk, roots, litter) were measured using an elemental analyzer (Eurovector, Redavalle, Italy) coupled to an Isoprime (Elementar UK). Analyses were carried out at the isotopic platform of B&PMP (INRA, Montpellier, France).

7.2.9. Isotopic calculations

The isotopic abundance for N in atom% (A_N %) is defined as

$$A_N\% = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N}} * 100 \quad (21)$$

The enrichment of ^{15}N in each compartment in each compartment is defined as

$$^{15}\text{N}_{\text{excess}} = A_{\text{N}\% \text{ (labeled compartment)}} - A_{\text{N}\% \text{ (unlabeled compartment)}} \quad (22)$$

where $A_{\text{N}\% \text{ labeled compartment}}$ is the ^{15}N abundance of the labeled compartment, $A_{\text{N}\% \text{ unlabeled compartment}}$ is the natural ^{15}N abundance of the unlabeled compartment, with a $A_{\text{N}\% \text{ unlabeled compartment}}$ of about $0.368306888 \pm 0.00306 \text{ atom}\%$ to $0.370893333 \pm 0.00127829 \text{ atom}\%$ according to the compartment. The unlabeled compartment came from the 10 unlabeled trees harvest in October 2015.

The concentration of ^{15}N ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ DM}$) incorporated by labeling in the dry matter (DM) of a given compartment was calculated as:

$$^{15}\text{N concentration} = ^{15}\text{N}_{\text{excess}} \times \frac{[\text{N}]}{100} \times 1000 \quad (23)$$

where $[\text{N}]$ is the N concentration ($\text{mg} \cdot 100\text{mg}^{-1} \text{ DM}$) of the compartment. The ^{15}N amount (g) incorporated by labeling into each compartment was calculated as

$$^{15}\text{N amount} = \frac{^{15}\text{N concentration}}{1000} \times \frac{\text{DM}}{100} \quad (24)$$

where DM is the dry matter (g) of the compartment. For practical reasons related to the impossibility of excavating fully the whole root compartment especially under drought treatment, we will not present the ^{15}N amount in the root system.

7.2.10. Total N and ^{15}N allocation in the aerial tree compartments

The total N or ^{15}N allocation is related to the distribution of N or ^{15}N within the different compartments (leaves, branches, trunk) of the whole aerial system (Dickson, 1989). Allocation of N and ^{15}N represented the ratio (%) of the amount of N or ^{15}N incorporated in a given compartment relative to the total amount of N or ^{15}N incorporated in the whole aerial system.

$$\text{N partitioning or } ^{15}\text{N allocation} = \frac{\text{N or } ^{15}\text{N amount of aerial compartment}}{\text{N or } ^{15}\text{N amount of the whole aerial system}} * 100 \quad (25)$$

7.2.11. Statistics

We applied a General Linear Model to our data to test the effect of treatment and date on each variable. To fit the assumption of normality, we carried out a log transformation on ^{15}N concentrations and an arcsin (root-square/100) transformation on partitioning (%). A Tukey test

was performed as a post-hoc analysis. Data were analyzed with the R software package (<http://www.r-project.org>, version 3.2.2, 2016-10-31). Values are presented as average \pm SE.

7.3. Results

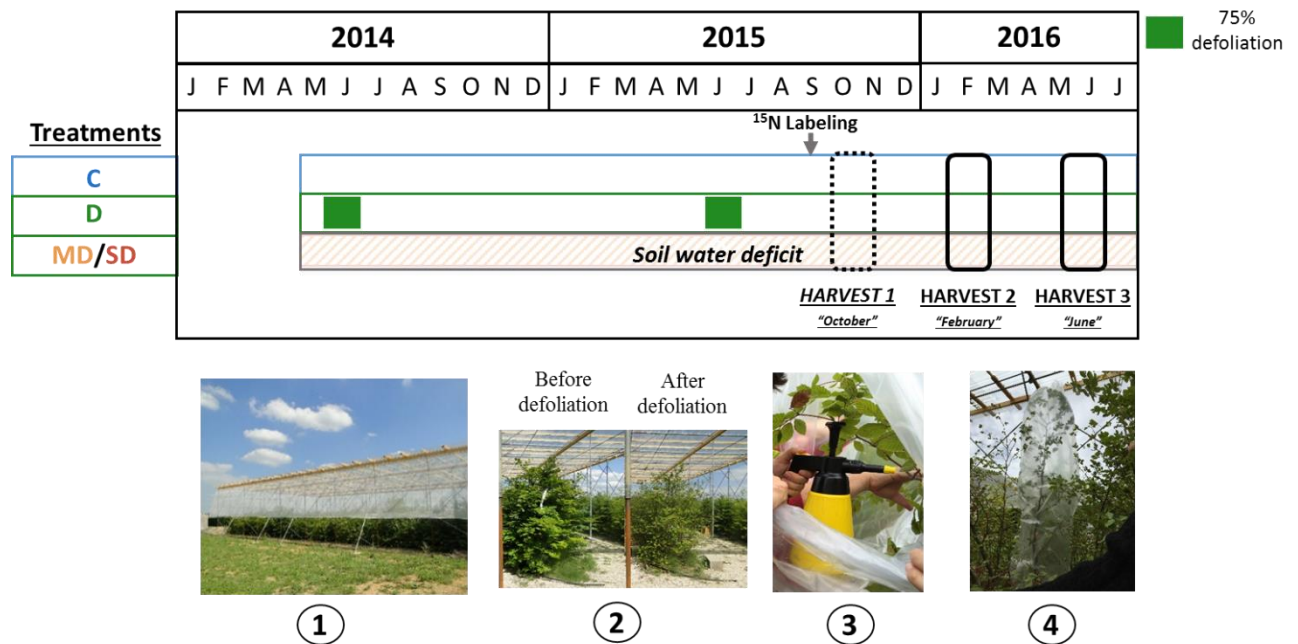


Figure VII.1. Schedule of the experiment since the onset of treatments in 2014 (photography 1 and 2). The foliar labeling was made in September 2015 with urea sprayer in a fine mist (photography 3), tree bag was installed before the labeling, remained during the night after labelling then removed the morning after (photography 4). First, we made a harvest one month after the labeling to confirm that the tracer was incorporated in perennial organs via leaf N resorption. Then, harvesting was made at two key phenological dates in February and June 2016. C is for Control, D for Defoliation, MD and SD for Moderate Drought and Severe Drought respectively.

7.3.1. Monitoring of water changes in soil and tree

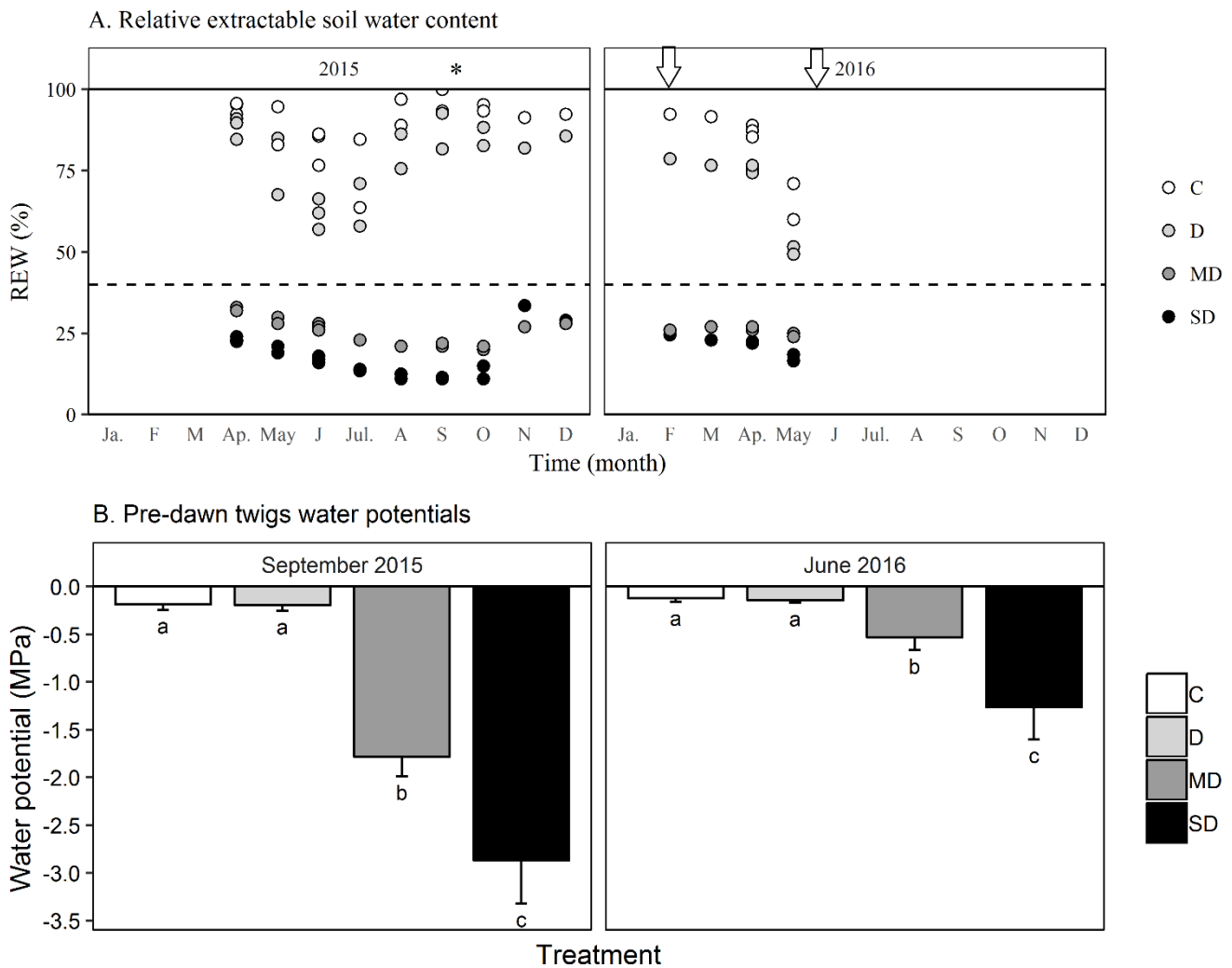


Figure VII.2. Seasonal dynamics of the relative extractable soil water content (REW, A) and the average pre-dawn water potential of twigs (B) in young beech trees during the year 2015 and 2016 in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). The dashed line (A) indicates the threshold value of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al., (1999). The star indicates the labeling time and the two arrows indicate the harvesting times. In B, different letters means a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date. Mean \pm SE, $n = 8$ trees in C and D, 5 in MD and SD in September 2015 and 6 trees in C and D, 3 in MD and SD in June 2016 for pre-dawn water potential of twigs.

The seasonal monitoring of the relative extractable water (REW) showed the progressive increase of soil water deficit with a continuous decrease of REW during the vegetative season in 2015 in the two treatments MD and SD (**Figure VII.2.A**). After the leaf fall, we observed a small increase of REW due to a small irrigation (40 mm). During all the experiment, REW stayed below the threshold of 0.4 in the MD and SD treatments. REW in C and D treatment showed a slight decrease after leaf expansion in spring 2015 and 2016, before the beginning of the irrigation, but it was above the threshold of 0.4 during all vegetative seasons. As a result of the progressive soil water depletion, the pre-dawn water potential (ψ_{pd}) of twigs (**Figure VII.2.B**) was lower in both drought-treatment (MD and SD), ranged between -1.5 and 3 MPa respectively, and were lower ($p < 0.001$) than C and D trees. SD trees displayed significant lower water potential values than MD trees ($p < 0.05$). In 2016, the pre-dawn water potential (ψ_{pd}) of twigs of C and D trees was significantly lower ($p < 0.05$) than the one of twigs of MD and SD trees.

7.3.2. Impact of two years of stress on development of the aerial system and on spring growth of the third year

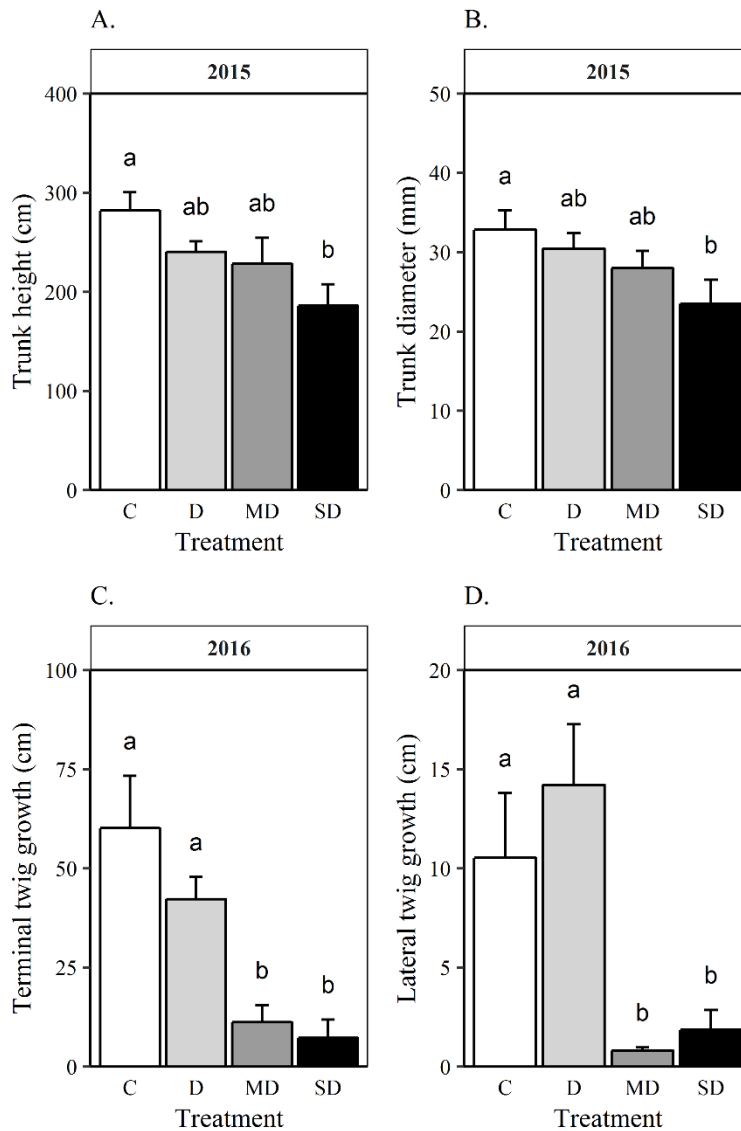


Figure VII.3. Mean height (A) and diameter (B) of the trunk at the end of the vegetative season 2015 and the mean terminal twigs (C) and lateral twigs (D) growth after the spring growth in 2016 in young beech trees in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE, $n=6$ for C and D and $n=3$ for MD and SD. Different letters mean a significant difference between treatments.

At the end of the vegetative season in 2015, i.e. after 18 months of constraints, we measured the diameter and the height of the trunk of trees (**Figure VII.3.A and VII.3.B**). The height and diameter of SD trees was smaller than C trees (-34% in height and -28% in diameter on average) whilst moderate drought (MD) and defoliation (D) did not affect significantly the height and diameter in 2015. In June 2016, we were not able to access to the diameter increment because

secondary growth was not finished when trees were harvested. We measured the primary growth of the terminal and one lateral twigs (**Figure VII.3.C and VII.3.D**). MD and SD trees exhibited significant reduction in growth ($p < 0.001$, -80% on trunk growth and -85% on lateral twigs growth on average) while defoliation did not impact the growth of terminal or lateral twigs.

7.3.3. Changes with time of leaf characteristics in response to treatments

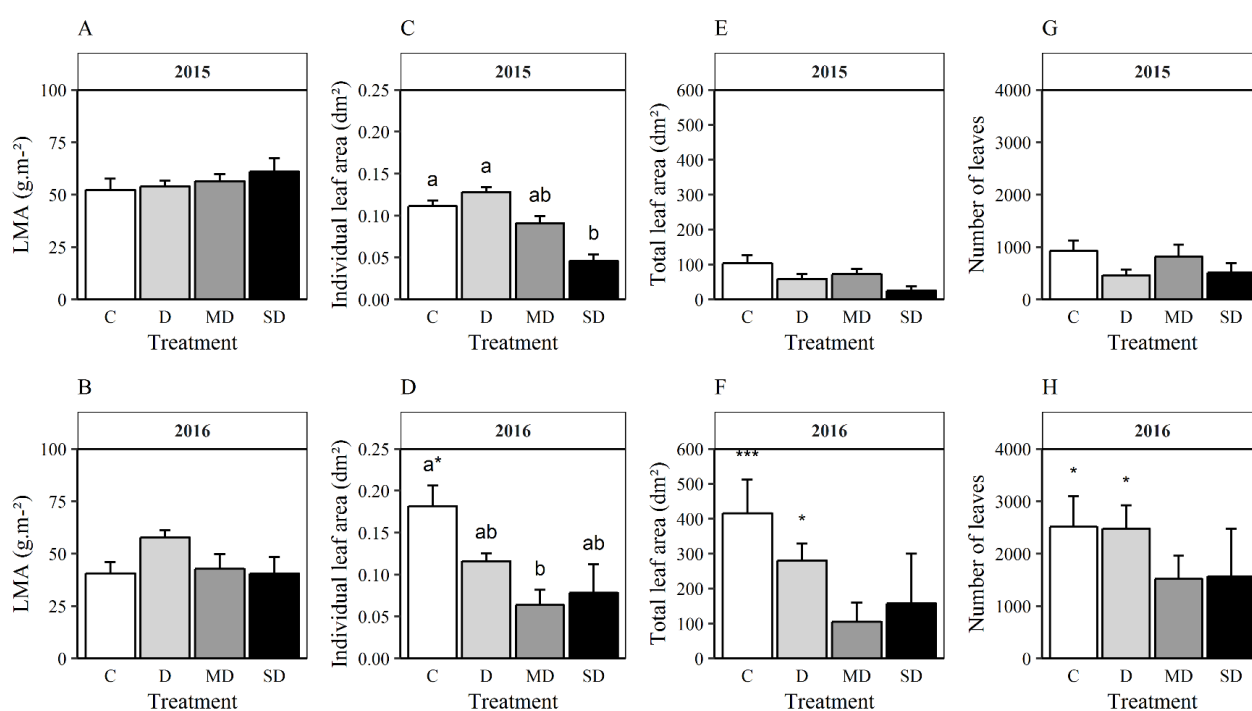


Figure VII.4. Change with time of leaf characteristics with leaf mass area (LMA; A,B), individual leaf area (C,D), total leaf area (E,F) and number of leaves per tree (G,H) at the end of vegetative season 2015 (top) and after the spring growth 2016 (bottom) in young beech trees in four treatments : moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE. $n=3$ trees for MD and SD and $n=6$ trees for D and C. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between treatments, stars indicate significant difference between years.

No effect of treatments were found on LMA (**Figure VII.4.A and B**) even if D trees seems to have a slight but not significant increase in LMA compared to others treatment in 2016. The individual leaf area was impacted by the most severe soil water deficit (SD) in 2015 (0.05 dm² in SD trees compared to 0.11 dm² for C trees) (**Figure VII.4.C**) but in 2016, it was MD trees

which had lower individual leaf area (0.06 dm²) than C trees (0.17 dm²) (**Figure VII.4.D**) An effect of the time between 2016 and 2015 was found on total leaf area on C ($p<0.001$) and D ($p<0.01$) trees (**Figure VII.4 E and F**). No significant effect of treatment was noted on the number of leaves in both vegetative seasons but an effect of time was noticed on C and D trees ($p<0.01$).

7.3.4. Evaluating of the autumnal ¹⁵N distribution among the tree compartments one month after the labeling

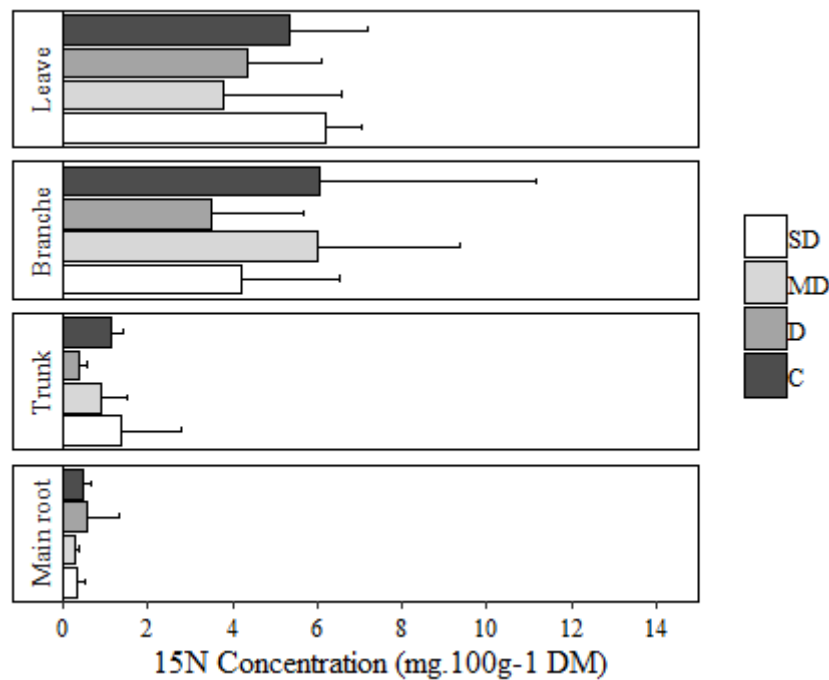


Figure VII.5. ¹⁵Nitrogen concentration (mean \pm SE, %DM) in above (leaves, branches, trunk) and belowground (main roots) compartments of young beech trees in October 2015 in the four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE, $n=2$.

We made the ¹⁵N labelling directly on leaves to follow the leaf N resorption to perennial organs. Thanks to the first harvest, we wanted to verify the incorporation of ¹⁵N and quantify if N resorption already occurred in mid-October. We found labelled nitrogen into all organs from leaves to roots. (**Figure VII.5**).

7.3.5. Nitrogen efficiency resorption at the end of 2015-leaf fall

Table VII.1. N concentration of green leaves (N green, %DM) in July 2015 and of marcescent leaves (N sen, %DM) in winter 2016 and the nitrogen resorption efficiency (NuR, %) in the four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). n=12 for N green for all treatments in July; n=6 for N sen for C and D treatments; n=3 for MD and SD treatments. Different letters indicate significant difference between treatment while stars indicate a effect of season between summer (Ngreen) and autumn (Nsen).

Treatment	N green	N sen	NuR
	%DM	%DM	%
C	1.83 ± 0.10 ^b	0.47 ± 0.07 ^{ab***}	58
D	2.28 ± 0.08 ^a	0.66 ± 0.10 ^{a***}	56
MD	1.86 ± 0.10 ^b	0.36 ± 0.12 ^{b***}	63
SD	2.08 ± 0.11 ^{ab}	0.51 ± 0.06 ^{ab***}	59

The N concentration of green leaves on mid-July 2015 ranged between 1.83% DM to 2.28 % DM for C and D trees, respectively (**Table VII.1**), leaf N concentration of D leaves were higher than MD and C leaves in July. In winter the N concentration in the marcescent leaves varied from 0.36% (C) to 0.66% (D) and leaf N of D leaves were higher than leaf N of MD leaves. A strong ($p < 0.001$) significant effect of the time between July and February has been found in all treatment. As a consequence, the NuR calculated ranged between 56% for D to 63% in MD treatment.

7.3.6. Changes in N and ¹⁵N concentration in tree compartments between winter and spring

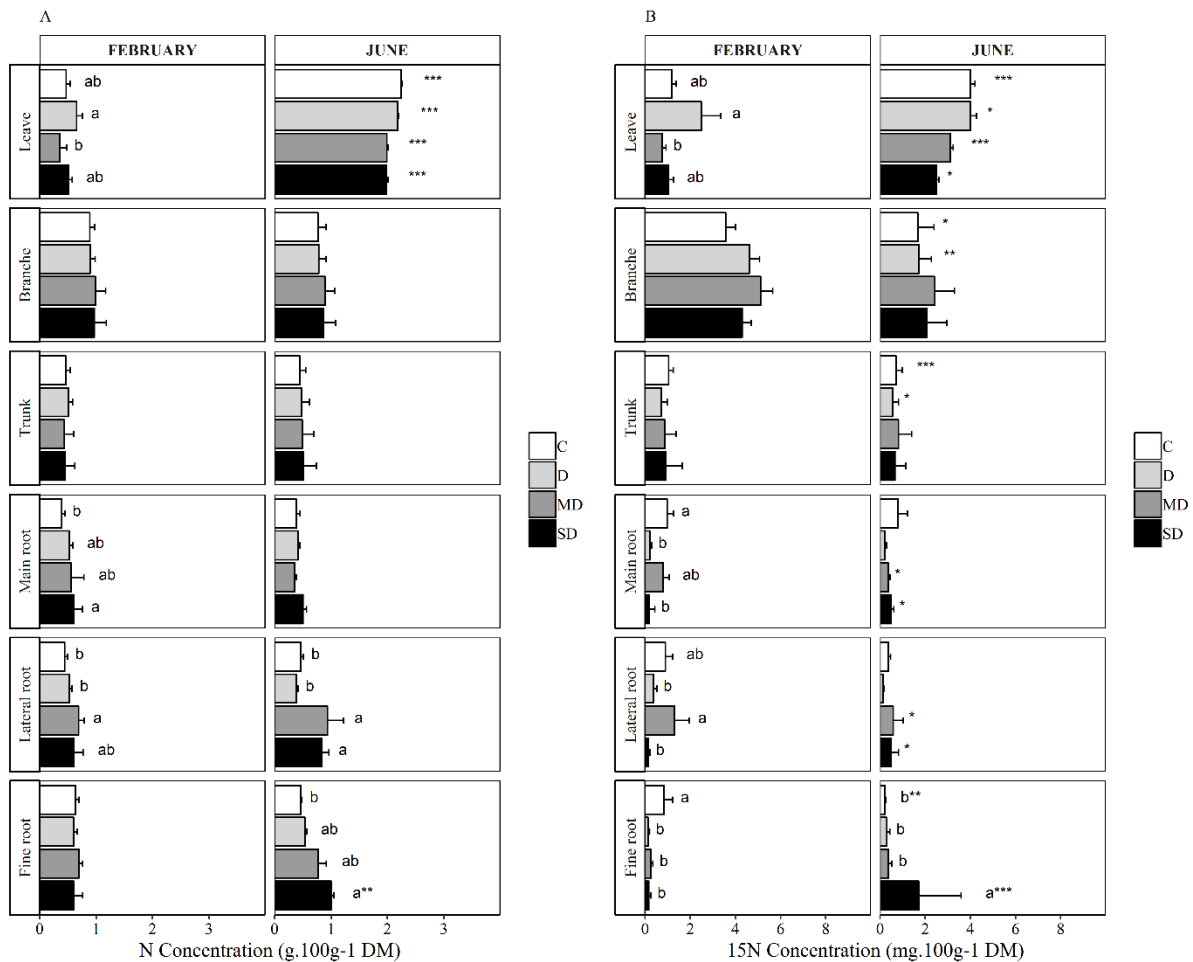


Figure VII.6. Changes with time of N (A) and ¹⁵N (B) concentrations (mean \pm SE, %DM) in aboveground (leave, branche, trunk) and belowground (main roots, lateral roots, fine roots) compartments of 10 year-old beech trees sampled in February and June 2016 in the four treatments : moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE. n=3 trees for MD and SD and n=6 trees for D and C. A stars means a significant season effect for a given treatment and a given compartment. * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001. Please note that leaves correspond to the marcescent leaves in February and to new leaves from new spring growth in June.

The **figure VII.6** presents the N (**Figure VII.6.A**) and ¹⁵N (**Figure VII.6.B**) concentrations of each tree compartment in February and June. In February, N values of marcescent leaves ranged from 0.35 to 0.65 g.100⁻¹ DM according the treatments. D trees displayed higher leaf N

concentrations than MD trees. N concentration in main roots of SD trees were higher (0.60 g.100g⁻¹ DM) than C trees (0.39 g.100g⁻¹ DM) while N concentrations of lateral roots of MD trees (0.69 g.100g⁻¹ DM) were higher than in C and D trees (0.44 and 0.52 g.100g⁻¹ DM). In June, an effect of soil water deficit were notified on N concentration on lateral roots with higher N concentration on MD and SD (0.83 and 0.93 g.100g⁻¹ DM) trees than C and D trees (0.47 and 0.39 g.100g⁻¹ DM) and in fine roots where SD trees had higher N concentrations than C trees (1.01 g.100g⁻¹ DM for SD and 0.46 g.100g⁻¹ DM for C). An effect of season, meaning a significant difference between June and February were measured on leaves for all treatment with more N concentrations in spring than in winter ($p<0.001$). Another effect of season with higher N concentration in June than in February were noticed on fine roots from SD trees ($p<0.01$).

When regarding the ¹⁵N concentration in February, e.g N which come from leaf N resorption in previous autumn, an effect of defoliation were notified with higher ¹⁵N concentrations in leaves of D trees (2.48 mg.100g⁻¹ DM) compared to MD trees (0.75 mg.100g⁻¹ DM). In June, we found an effect of treatment only on SD trees for fine roots (1.73 in SD versus 0.21 mg.100g⁻¹ DM in C trees). Time has an effect on leaves concentrations from trees in all treatment while ¹⁵N concentrations of branches displayed lower values in June than in February on D ($p<0.01$) and C trees ($p<0.05$). Lower values were also found for trunk concentrations in C ($p<0.001$) and D ($p<0.05$) trees. Finally, a significant season effect were also found on MD and SD trees for main and lateral roots and on C trees for fine roots. In summary, higher N and ¹⁵N concentrations were found in July on leaves while ¹⁵N concentrations in branche were lower in June than in February.

7.3.7. Changes of N and ¹⁵N quantity in the compartments of the aerial system between winter and spring

Table VII.2. Seasonal changes of biomass, nitrogen and ¹⁵N amounts in aerial compartments of young beech trees (leaves, branches and trunk) in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C) in February and June 2016. Different superscript letters indicate significant difference between treatments for a given date. A significant seasonal effect is indicated with stars (; $p<0.05$, **; $p<0.01$; ***; $p<0.001$). Note that leaves correspond to marcescent leaves in February and to new leaves from spring growth in June.*

Organs	Treatment	Biomass (g)		N quantity (g)		¹⁵ N quantity (mg)		Seasonal effect
		February	June	February	June	February	June	
LEAVE	C	48.5 ± 15.6	146.6 ± 36.8	0.25 ^a ± 0.09	3.29 ^a ± 0.84	0.63 ^a ± 0.22	6.08 ^a ± 1.71	***
	D	20.2 ± 5.3	122.1 ± 30.2	0.12 ^{ab} ± 0.03	2.67 ^{ab} ± 0.66	0.41 ^a ± 0.1	4.93 ^a ± 1.23	***
	MD	28.1 ± 13	38.9 ± 13.2	0.12 ^{ab} ± 0.07	0.78 ^b ± 0.27	0.24 ^{ab} ± 0.13	1.2 ^{ab} ± 0.39	*
	SD	5.5 ± 2	43.1 ± 32.6	0.03 ^b ± 0.01	0.87 ^b ± 0.66	0.05 ^b ± 0.01	1.11 ^b ± 0.88	**
BRANCHE	C	168.8 ± 97.2	255 ^a ± 84.4	1.51 ± 0.93	1.76 ± 0.54	3.93 ± 1.72	2.8 ± 0.67	
	D	147.6 ± 49	184 ^{ab} ± 37	1.32 ± 0.45	1.4 ± 0.26	6.33 ± 2.59	2.62 ± 0.55	
	MD	115.2 ± 50.8	106.7 ^{ab} ± 18	1.05 ± 0.44	0.94 ± 0.19	4.16 ± 1.77	2.35 ± 0.59	
	SD	47.3 ± 25.1	58.9 ^b ± 5.1	0.46 ± 0.27	0.46 ± 0.03	1.68 ± 1.03	0.96 ± 0.12	
TRUNK	C	395.1 ± 93.5	674.8 ± 180.6	1.67 ± 0.44	2.06 ± 0.73	3.69 ^a ± 0.8	2.33 ± 0.63	
	D	349.5 ± 106.9	394.2 ± 52.5	1.56 ± 0.48	1.25 ± 0.2	1.94 ^{ab} ± 0.63	1.03 ± 0.13	
	MD	276.6 ± 99.7	340.8 ± 137.4	0.81 ± 0.23	1.02 ± 0.48	1.38 ^{ab} ± 0.24	1.18 ± 0.56	
	SD	129.3 ± 80.6	296.5 ± 95.4	0.41 ± 0.23	1.02 ± 0.34	0.53 ^b ± 0.21	1.15 ± 0.53	

A significant seasonal effect were noticed on D ($p < 0.001$) and SD ($p < 0.05$) trees on leaves biomass but not on MD and C trees (**Table VII.2**). Higher biomass of twigs were found on C trees compared to SD trees (255g versus 58.9g, $p < 0.05$). No effect of soil water deficit or defoliation were found on the biomass of trunk and no effect of defoliation were found in any compartment compared to C trees. Higher leaf N quantity were measured on C trees (0.25g) compared to SD trees (0.03g) in February and in June (3.73g for C and 0.87g for SD) and C was also different from MD in June (0.78g). Significant difference of season were found in all treatment for leaves N quantity. When regarding N quantity on branches and trunk in February and June, no effect of treatment were found. Finally, the soil water deficit reduced drastically the ^{15}N quantity measured in leaves (0.05 mg in SD and 0.63 mg in C trees) but also in trunk (0.53 mg in SD and 3.69 mg in C trees) at the end of the resorption period. In June, the soil water deficit reduced also drastically the ^{15}N quantity found in the leaves (1.11 for SD trees) compared to C and D trees (6.08 and 4.93 mg, respectively). The same tendency was observed in the trunk and the branches but these differences were not significant. The ^{15}N quantity did not change significantly in the branches and the trunk among the seasons in the four treatments whereas it increased in the leaves between February and June. This increase were more important in the C and D treatments (+6.27mg for C and +5.92mg for D) than in the drought treatments (+1.26mg for MD and +1.22mg for SD).

7.3.8. Biomass, nitrogen and ^{15}N partitioning and allocation among tree compartments

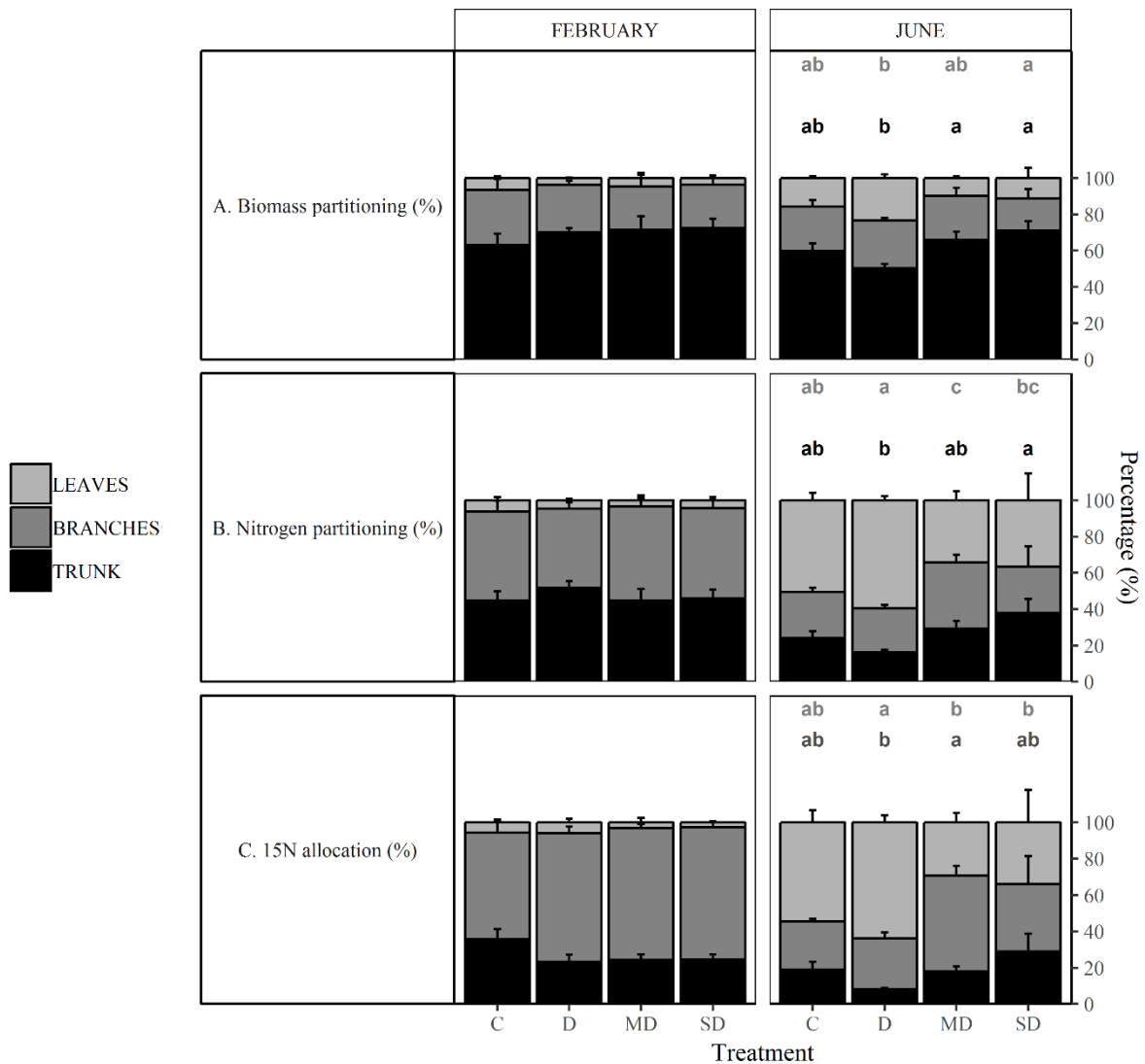


Figure VII.7. Biomass (A), nitrogen (B) partitioning and ¹⁵N (C) allocation between aboveground organs (leaves, branches, trunk) of young beech trees in February and June 2016. Each line of letters indicates significant differences between treatment for a given organ: lower black letters for trunk, middle grey letters for branches and upper letters for leaves. n=6 for C and D and n=3 for MD and SD. Note that leaves correspond to marescent leaves in February and to new spring leaves in June.

In February, the biomass partitioning (**Figure VII.7.A**) were mainly on trunk which represented up to 60% in all treatment followed by branches biomass. Litter biomass were minor with less than 10%. No difference on biomass partitioning was found in February among treatments. In June 2016, at the theoretical end of spring remobilization, the biomass of trunk consists still as the main partitioning, but, contrary to February, the biomass partitioning was different between

D and MD and SD trees with higher trunk biomass and lower leaves biomass in SD than in D trees.

When regarding N partitioning (**Figure VII.7.B**) in February, in all treatments, the trunk and branches were the two highest contributors with more than 40 % for each and only less than 10% left in litter. In June, the main organs for N partitioning was leaves in all treatments but higher values were observed in D trees than in MD and SD trees while C trees had higher N partitioning on leaves than MD. The N partitioning in trunk was higher in SD trees compared to D trees.

The ^{15}N (**Figure VII.7.C**), *e.g* the mobile N which come from leaf N resorption, in February were mainly located on branches (up to 70%) followed by trunk and very few in leaves. In June, the ^{15}N which is remobilized for spring growth were located mainly on leaves for C and D trees. In MD and SD trees, the ^{15}N stay mainly into branches (40%) where it was also mainly located in February. The ^{15}N partitioning in leaves was strongly lower in drought treatments than in D. The ^{15}N partitioning in trunk was the lowest in all treatments.

7.4. Discussion

In the present study, we submitted trees to prolonged drought or defoliation stress during two years and the first consequence was a reduction of the growth in the drought treatment whereas defoliation did not affect growth. Reducing growth following drought events is a common response of beech trees in various site (van der Werf *et al.*, 2007; Charru *et al.*, 2010). Is N limitation could explain the decrease of growth rate following drought or defoliation?

We found during the summer 2015 that trees under water deficit or defoliation still have high leaf N concentration, especially in D trees. Such high N concentration on leaves might be not entirely related directly to photosynthetic machinery but e.g on osmotic tolerance with amino acids, such as proline, which can act as an osmoprotectant or to compensatory photosynthesis after the defoliation. Such high partitioning to leaves and more particularly to foliar protein could be also a strategy for local nitrogen storage as hypothesized in others studies (Ourry *et al.*, 2001; Millard *et al.*, 2007). During 2015-vegetative season, high tree N quantity must had be found on leaves and, consequently, defoliation must had resulting of a major loss of N and through the decrease of REW observed since the beginning of our experimentation on drought treatment soil N availability must be decreased.

In autumn, prior to dormancy, deciduous species shed their leaves. Nutrient resorption is a fundamental process by which tree can withdraw nutrients from senescing tissues prior to abscission (Lu *et al.*, 2012). Our ^{15}N foliar labelling experiment was made at the end of September. At the time of labelling, leaves was still green and we can be confident that senescence was not occurring at this time. Tracking the storage process by applying enriched nitrogen was one goal of this study. This goal was reached as we found ^{15}N on leaves but also on woody parts one month after the labelling, in October. The color of leaves changed between the time of labeling and the time of the first harvest passing from pronounced green to lighter green or yellow indicating that change in pigments or chlorophyll shall occur. As pigments are made of N, it was a good way to determine if senescence occurs visually. Consequently, we can be confident that N resorption already occurred between labelling and the first harvest.

7.4.1. Branches as the main storage location of N from autumn resorption

Recycling N from leaves to perennial parts shall end in February (El Zein, 2011), at the time of our second harvest. Indeed, our results go on this way as N and ^{15}N concentrations found on

leaves in February was lower than in October ($N_{\text{leaf in July}} > N_{\text{leaf in October}} > N_{\text{leaf in February}}$). Such result indicate that in October, leaf N resorption was not finished. Previous studies have shown that nutrient resorption can account for ~31% of annual tree nitrogen (Cleveland *et al.*, 2013) and where temperate deciduous tree may exhibit the most N resorption (Hai-Yang *et al.*, 2018). Low leaf N concentration was found on litter indicating that N resorption was very efficient among treatment. Compared to vegetative season, about 60% of leaf N was recycled in all treatment and it was in accordance with those found in meta-analysis by Hai-Yang *et al.*, (2018). This result contradict our second hypothesis which was that under stress, trees will intensify its leaf N recycling. However, we can hypothesize that the rate of N that was able to recycle in autumn was not so far from 60%. Indeed, the remaining leaf N in the litter was probably a mix from structural N and non-structural N as we found small but still concentration of ^{15}N in the litter. Considering only the aerial parts of trees (excluding roots) leaf N containing in the litter represented less to 5 percent. However, total resorption were not possible because some N shall be fixed into structure and, so, cannot be recycled.

We found that closest organs from leaves, *e.g* branches, were the main sink organs for recycled N and less to distant organs such as roots and trunk as found on other studies on Mediterranean oak species (Mooney and Hays, 1973; Cherbuy *et al.*, 2001; Palacio *et al.*, 2018). It could be a strategy for trees to keep N near from leaves for the next spring to reduce the cost associated to the remobilization. Another reason is considering that youngest twigs was the most active perennial organs and could suffer more from freezing damage, as negative temperatures and cold episode occurred often in Lorraine's Region during winter and amino acids such as proline can act as a protection against freeze hardiness (Janska *et al.*, 2010).

7.4.2. Impacts of two years of soil water deficit or consecutive defoliation on internal N quantity

If the aim of the defoliation was to significantly decrease internal N pool as up to 30% of total N in June (El Zein *et al.*, 2011), our results tend to say that it was not the case. Indeed, same N quantity has been found stored in trunk in D and C trees. In contrast to defoliation, trees which presented the lowest values of pre-dawn water potentials (SD) exhibited lower N quantity than control trees on aerial perennial organs. Under mild drought, soil exploration could be increased as observed by Gruber *et al.*, (2013) by increasing the total absorptive surface of root systems towards high nutrient soil patches (Kiba and Krapp, 2016). In our study, considering the dryness of the soil of the drought treatment, no root growth was possible (J.Levillain, personal

communication). Despite an efficient leaf N resorption of MD and SD trees, the limitation or even suppression of the root N uptake during consecutive vegetative seasons induced N reserves very scarce compared to irrigated trees. Consequently, under continuous severe N limitation due to drought, trees might be not able after a certain duration of soil water deficit to meet their N demand.

7.4.3. Spring remobilization could be impacted by recurrent drought treatment but not through defoliation.

In spring, stored N are remobilized and used for initial growth of beech trees (El Zein *et al.*, 2011a; Bazot *et al.*, 2013). As in 2015, 2016-growth was repressed in MD and SD trees in both trunk and branches. A decrease of trunk growth has been also found on D trees. Others studies found also a decrease of growth following defoliation on seedlings of *Quercus velutina* (Wiley *et al.*, 2013), saplings (Maguire *et al.*, 2015, Schmid and Palacio, 2017) or on mature trees of *Northofagus pumilio* following defoliation (Piper, 2015). After two consecutive yearly defoliation, D trees exhibited the same number of leaves than C trees. Following defoliation, higher LMA was generally found in others studies (Millard *et al.*, 2001; Nabeshima *et al.*, 2001). When computing multidinous data on experimentation on tree mortality worldwide, Greenwood *et al.*, (2017) showed that tree species with lower SLA (which is 1/LMA) showed lower mortality responses. Whereas LMA was not significantly different among treatments in October 2015, after the new leaf flush in 2016, LMA in D trees was still not significantly but slightly higher than control. Adaptation of deciduous trees to defoliation has been suggested by authors (Krause *et al.*, 1993; Piper, 2015) and making smaller leaves to reduce the cost in case of defoliation could be an adaptation to defoliation. However, in our study, smaller individual leaves has been noticed only after the second defoliation making this assumption only true when recurrent defoliation occurs.

Contrary to carbon remobilization that is sink driven, N remobilization in spring is thinking to be source driven and may not be affected by current N availability in the soil during the growing season (Millard, 1996; Millard and Grelet, 2010). Bud removal experiments have demonstrated that N remobilization is driven by the size of the storage pool and not by the sink strength (Millard *et al.*, 2001; Millett *et al.*, 2005). To sustain leaf flush and spring growth, trees mainly used the recycling N in perennial organs from previous season (*e.g.* ^{15}N) in C and D treatment but not at the same rate than in MD and SD treatment. The main sink for N remobilization in spring was leaves as 50-60% of recycled N in previous winter was remobilized in C trees

whereas only 35% and 30% in MD and SD trees. Sustain leaf metabolism is still a key priority for trees under disturbance but disruption of transport system could also explain why only one third of the remobilized N was found on leaves. Both disruption of transport system and the source-driven hypothesis may explain why less previous N recycled was allocated to new leaves flush.

7.4.4. Growth limitation as a consequence of N shortage?

Trees did not seem to be under nitrogen limitation following two harsh yearly defoliation. Consequently, the small decrease on tree growth after defoliation might be not a consequence of solely a N limitation so, others hypothesis could be made on what factors can limit growth. Although, we can hypothesize also that tree growth repression could come not from a single source but from a combination of a lack of carbon and nitrogen induced by defoliation, or by others nutrients such as calcium or potassium. Another explanation could be a tradeoff between storage and growth (Palacio *et al.*, 2014; Piper, 2015) such as a preventative allocation shift. Such tradeoff is thought to be an adaptation of deciduous species to defoliation, as it can be remobilized to meet demands for re-foliation and growth when root nutrient uptake fails (Millard *et al.*, 2001; Millard and Grelet, 2010). Finally, finding an explanation on why tree under defoliation did not present evidence of N limitation could have a response on belowground systems. D trees were under irrigation systems in the same way that C trees and tree roots system responses to defoliation should be central to regulating the long-term effects of defoliation. Study have found that following defoliation, root N uptake can decrease quickly after defoliation (Parsons *et al.*, 1983; Jarvis and Macduff, 1989; Kosola *et al.*, 2001) or not (Fotelli *et al.*, 2004; Peuke and Rennenberg, 2004). As compensatory mechanisms of photosynthesis could occur after defoliation as found on the same experiment in 2015 (**Chapitre V**), defoliated trees can invest more NSC to belowground organs and export to root, where the carbon is rapidly assimilated into amino acids at the site of N uptake (Roche *et al.*, 2017) leading to re-enhance of root N uptake. Such results could be also explain by our soil composition which come from an agricultural soil which is richer than natural forest soils regarding available nutrients.

Perennial tree lifecycle regarding N ressources consists to a strong remobilization of stored N to sustain growth and leaf expansion at the beginning of vegetative before rely on current N uptake and, finally, by a strong N resorption from leaves to perennial organs. Consecutive to the onset of soil water deficit, N uptake must had depressed leading to less new incomings to

sustain N metabolism. As we found strong N resorption, it could be a strategy for trees under severe soil water deficit to work as a “closed system”. Our finding that less previously resorbed N has been reallocated to new leaf flush could argue as the view of “closed system”. Indeed, even if allocate N to leaves is essential to have a production of new photosynthetates through photosynthesis, keeping more N to perennial parts could be a strategy to prevent risks from defoliation, which is a common drought response (Bréda *et al.*, 2006; Galvez *et al.*, 2011; Ryan, 2011). Furthermore, we also found that little but still N was “lost” in the litter (up to 30% of initial leaf N) and during a period of strong reduction of N uptake, such a loss could be hazardous for survival. As we found strong growth reduction, our results could argue in favor of an allocation shift by decreasing growth in favor of storage. However, we must be careful with such interpretation as we do not have access to the quantity of N left on belowground organs. Finally, in the same way than for defoliation, we can also make the hypothesis that other compounds might be missed to explain this growth reductions such as carbon, potassium, calcium ...

7.5. Conclusion

Currently, a growing debate on whether extreme disturbance associated with climate change (e.g. defoliation or drought) provoke N limitation in trees (Millard and Grelet, 2010). Our study provides a valuable knowledge about how internal N cycling and recycling could have been impacted by disturbance, by using a labelling tool. We were able to show a significant reduction of N stored in trees under severe soil water deficit which is really difficult to show under natural drought conditions. To succeed to prove that trees can be under N privation, we made 24 month of drought treatment, which underline also the resistance of this deciduous species to extreme constraints.

CHAPITRE 8:

**Article 4: WHAT ROLE DOES STORAGE FUNCTION
PLAY IN THE DEATH OF FAGUS SYLVATICA L.
TREES? (soumis à Journal of experimental botany)**

VIII. WHAT ROLE DOES STORAGE FUNCTION PLAY IN THE DEATH OF *FAGUS SYLVATICA* L. TREES?

CHUSTE P.A¹, MAILLARD P.¹ and MASSONNET C.¹

¹INRA, UMR 1434 SILVA, 54000 Nancy, France

Correspondance author: catherine.massonnet@inra.fr

ABSTRACT:

Climate change modelling projects tree mortality in response to recurrent severe drought but this prediction requires experimental validations. Face drought events, *Fagus Sylvatica* L. is a species whose cambial growth is strongly limited but presents a high survival ability. We evaluated the role of carbon (C) allocation between the growth and storage functions in relation to beech's survival under prolonged drought conditions. We investigated the consequences of a three-year drought induced by a rain exclusion system on survival rate, growth and Non Structural Carbohydrates (NSC) dynamics with starch and soluble sugar in eight-year-old beech trees. We compared growth and storage partitioning in the aboveground compartments of control and drought-subjected trees. The *Fagus Sylvatica* L. trees presented a survival rate of 87% after three years of drought. In dead trees, stored C was almost completely depleted, whereas C storage was maintained in surviving trees, suggesting that resistance to the prolonged drought was related to a C allocation strategy that favoured storage at the expense of growth. Maintaining an active C storage function was certainly key to *Fagus s.* survival under prolonged extreme drought conditions. This implies that process-based models predicting mortality should better take into account C storage and remobilization processes.

Keywords: carbon partitioning, carbon starvation, *Fagus sylvatica* L., growth, mortality, Non Structural Carbohydrates (NSC), remobilisation, storage

8.1. Introduction

Carbon (C) storage in trees consists in accumulating photosynthesized carbohydrates as soluble sugars and starch which make up remobilizable nonstructural carbohydrates (NSC) (Dietze *et al.*, 2014, Hoch *et al.*, 2015). Other C compounds like lipids or hemicellulose may also be stored and remobilized for maintaining tree functions and survival (Hoch *et al.*, 2003, 2007). Remobilization of stored compounds is of primordial importance for maintaining survival and functions such as growth, defense or maintenance under limited or no photosynthesis (Chapin *et al.*, 1990). The contribution of remobilized compounds to maintenance of tree metabolism on diurnal or seasonal scales (Li *et al.*, 2002, Hoch *et al.*, 2003, Hartmann and Trumbore, 2016) and during periods of decreased photosynthesis caused by climatic hazards or biotic attacks is crucial (McDowell *et al.*, 2008, 2010, Hoch *et al.*, 2015). Remobilization of C compounds may also help to prevent any tissue dehydration (i.e cell elongation and differentiation), through a transitory increase of NSC shortly after the onset of a drought event due to a higher impact of the dehydration on C sink activity than on photosynthesis (Boyer *et al.*, 1970, Muller *et al.*, 2011). Knowledge is scarce on the importance of storage and remobilization processes involved in the responses of forest trees to long-term drought. In particular, the consequences of a prolonged drought on NSC storage levels in perennial compartments of forest trees remains to be evaluated. However, in case of a prolonged drought and lowered C assimilation a decline in NSC is expected as a result of C storage mobilization and use for maintenance, respiration, osmoregulation or even for refilling of cavited vessels (McDowell *et al.*, 2008, 2011; Hoch *et al.*, 2015).

In recent years, climate change has caused more intensive and frequent drought resulting in extensive tree mortality and forest decline worldwide (Anderegg and Anderegg, 2013, Bouche *et al.*, 2014, Gaylord *et al.*, 2015). Many studies have focused on the causes, consequences, climatic thresholds and models of drought-induced mortality (Breshears *et al.*, 2009, Martínez-Vilalta *et al.*, 2012, Anderegg *et al.*, 2013, McDowell *et al.*, 2013, Gustafson, 2014, Gu *et al.*, 2015). Nevertheless, the physiological mechanisms underlying tree mortality are not all identified and their respective importance are still being debated (Anderegg *et al.*, 2012; Sevanto *et al.*, 2014; Meir *et al.*, 2015). Several hypotheses have been proposed concerning these mechanisms (McDowell *et al.*, 2008). One of them is C starvation (CS) which may happen under prolonged soil water deficit due to consumption of C reserves whilst stomatal closure leads to restricted C uptake, assimilation and translocation (Pangle *et al.*, 2015). However, CS

is not the only mechanism thought to be involved in the cascade of events leading to tree mortality and other non-exclusive mechanisms have been highlighted by the scientific community such as hydraulic failure, phloem dysfunction, nitrogen starvation combined or not with opportunistic biotic attacks (Sala *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2016; Dannoura *et al.*, 2018). Considering the importance of storage in adult forest trees, CS may occur late after several years of prolonged drought (McDowell, 2011, Kulac *et al.*, 2012, Klein *et al.*, 2014) which can be very challenging to observe in experimentations.

To test the CS hypothesis and its involvement in the drought-induced tree mortality, a whole tree approach and an exhaustive estimating of tree stores changes with time and are needed. Indeed, drought may reduce NSC concentrations locally rather than at the whole tree level (McDowell and Sevanto, 2010, Galvez *et al.*, 2011, Gruber *et al.*, 2012) and each perennial organ (roots, branches, trunk) could have a specific NSC dynamics that need to be considered (Korner, 2003, Trumbore, 2006, Gaudinski *et al.*, 2009, Muhr *et al.*, 2013, Dai *et al.*, 2018).

A better understanding of tree mortality need also to consider tree ontogeny because seedlings and adult trees of the same species differ strongly in their physiology (Thomas *et al.*, 2002, He *et al.*, 2005, Baber *et al.*, 2014). Moreover, the increased mortality of trees at young developmental stages is a likely consequence of their limited rooting depth, which make smaller trees more susceptible to hydraulic failure than carbon starvation (Hanson and Weltzin, 2000). In older trees, the combination of greater below-ground exploration (Lloret *et al.*, 2004), higher carbohydrate storage relative to demand, higher water stores and lower transpiration per unit leaf area (Tyree, 2003) should improve the tree resistance to prolonged drought. But unfortunately, studies on large, mature trees remain scarce (*e.g* Gérard and Bréda, 2012; Cailleret *et al.*, 2014; Gaylord *et al.*, 2015) whilst Hartmann *et al.*, (2018) and Bussotti *et al.*, (2018) insist on the need to focus on mature trees when working on tree responses to a stress to have a better understanding on how future trees will cope with extreme disturbance engaged under climate change.

Fagus Sylvatica L. tree is a very widespread specie in European temperate forests. The effect of drought on radial and cambial growth of beech trees has been studied for a long time (Leuschner *et al.*, 2001, Dittmar *et al.*, 2003, Lebourgeois *et al.*, 2005, Bréda *et al.*, 2006, Granier *et al.*, 2008, Fotelli *et al.*, 2009) and these studies demonstrated drought impacted negatively beech growth. Beech is shown to be adrought-sensitive species especially under strong and prolonged drought (Backes and Leuschner, 2000, Rennenberg *et al.*, 2004, Gessler *et al.*, 2007, Granier *et al.*, 2007, Tegel *et al.*, 2014, Hentschel *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2017).

Consequently, growth performance of beech trees under climate change could be negatively impacted by an increasing frequency and intensity of drought events in the context of climate change (Gessler *et al.*, 2007, Simon *et al.*, 2017). Paradoxically, little mortality was described in this species notably following 2003-drought event (Eichhorn *et al.*, 2005).

In our study, we submitted 8-year-old beech trees to an extreme and prolonged drought for 30 months which we hypothesized sufficient enough to induce tree mortality. Our aim was to follow how a prolonged severe drought would modify the C allocation scheme between growth and storage functions and to discuss the possibility of a causal relation existing between storage level and tree mortality.

We made the following hypotheses: (1) in a first step water-stressed trees will maintain their storage function and increase locally their NSC to maintain tissue hydration then in a second step due to still lowered photosynthesis (2) NSC will be remobilized for ensuring growth and maintenance at the expense of storage function ; in a third step (3) water-stressed trees will survive through consuming the rest of their C reserves and (4) finally die from carbon starvation or to the impossibility to remobilize stored NSC from C source to C sink.

8.2. Materials and methods

8.2.1. Experimental design and growth conditions

The study was conducted on European beech (*Fagus sylvatica* L.) trees. In 2006, *Fagus sylvatica* L. seeds were collected in the Lorraine forest (France) and sown in 2007 in biodegradable horticultural pots made of wood fiber and filled with peat and sand mixture. The seedlings were grown for one year in a nursery (INRA Grand-Est Nancy, France). In 2008, about 1000 of the seedlings were transplanted and grown for 7 more years in open ground at the INRA Grand-Est nursery (Champenoux, France, 48°75'N, 6°34'E, 229m asl). In 2014, a rain exclusion system was built above the 8-year-old trees: a semi-rigid structure supporting a transparent roof built with polycarbonate sheets and nets installed around the roof to intercept lateral rain. The soil in the drought treatment was isolated by a rigid and waterproof plastic sheet 1.80 meters wide buried around the area. Light intensity, air temperature and vapor pressure deficit were monitored below the roof. The trees under the roof were submitted to drought during three consecutive vegetative seasons (2014, 2015 and 2016). The drought stress level was not designed to realistically simulate a climate change scenario, but rather to create drought conditions that were so unfavorable that they would likely cause beech mortality. The hydraulic status of a sub-set of trees in each treatment was checked by measuring pre-dawn water potential in twigs (ψ_{pd}) throughout the experimental duration in 2015 and 2016. We sampled one twig per tree before sunrise and performed the ψ_{pd} measurement with a pressure chamber (PMS Instruments, Albany, OR, USA). The height and diameter of the trunk of the whole population of trees (n=336 for each treatment) was measured at the end of vegetative season. The diameter of the trunk was measured at the collar.

8.2.2. Soil characteristics and soil water measurements

The studied site was characterized by a 60cm deep homogenous soil with an average texture (Silt: $61 \pm 1.28\%$; Clay: $27 \pm 0.98\%$; Sand: $12 \pm 0.66\%$), a pH comprised between 7.5 and 8 and an organic matter content between 12.1 and 14.9 g.kg⁻¹ (E Silva, 2010). Below 60cm, the grey marl of the Jurassic inferior (Lotharingian) era was characterized by a swelling heavy clay soil with a relatively high bulk density.

We used neutron probes (TROXLER TX 4301, Research Triangle Park, NC, USA) to measure the volumetric water content of the deep soil. Three neutron probe access tubes (aluminum, closed at their base) were installed in each of the two treatments areas in order to quantify water

content at different depths: two of which ranged from 0-1m in depth and one ranged from 0-1.6m. Each tube was calibrated with the method described in Normand et al. (1974). During the growing season, measurements were carried out every two weeks. Counts were logged every 10 cm for the upper 100 cm, and every 20cm below that. For each depth i (thickness t_i), Total Available Water soil Content (TAWC in mm) was calculated by estimating the characteristic points from pedotransfer classes for gravimetric soil moisture at field capacity (θ_{fc}) and gravimetric soil moisture at wilting point (θ_{wp}). The characteristic points were checked and adjusted with probe measurements, during winter for volumetric soil moisture at field capacity and during summer for volumetric soil moisture at wilting point. Soil bulk density was assessed with the cylinder method. Relative Extractable soil Water (REW in %) was calculated according to Bréda *et al.*, (1995) as follows:

$$REW=100* \frac{TAWC-R}{TAWC} \quad (26)$$

where R is the actual volumetric soil water content in mm, and total soil extractable water volume up to 1.60m is estimated at 310 mm.

The soil in the C treatment was irrigated regularly throughout the experiment with an automatic drip watering system which delivered between two and four liters per tree two to three times a week. We adjusted the amount of the water according to the REW measurements in order to avoid any water shortage ($REW > 0.4$), with 40% of the REW corresponding to the critical threshold where trees start to avoid water loss by closing their stomata (Granier *et al.*, 1999).

8.2.3. Sampling and organ conditioning

Trees were harvested on October 2015, June and then October 2016 to cope with key phenological dates for NSC dynamics as mentioned in a previous study (Barbaroux et al. 2002). Mortality was determined by a sudden drying of leaves at the tree scale and a change of the color of the bark. A scheme of a tree and its sampling by organ type is presented in **Figure VIII.1**. Aboveground parts were separated into branches (excluding buds) and trunk. Whole parts of trunk and branches were dry weighted to assess the total dry weight of each aerial part of tree. Samples of each organs were taken for NSC analyses. More precisely, three branches randomly chose was split in annual growth [current year (Y), 1-year-old (Y-1) and older (<Y-1)]. Three samples of trunk were taken along the height: the top [High trunk], the middle [Mid-h trunk] and the base of the trunk [Base trunk]. At each harvest excepting October 2015, roots

were gently cleaned using tap water then separated according to their diameter: fine roots ($d < 1\text{mm}$), lateral roots ($1 < d < 3\text{mm}$) and main roots ($d > 3\text{mm}$). All fresh samples were weighted, then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before being freeze-dried (Dura-Top^(r), Dura-Dry^(r), FTS Systems^(r), Stone Ridge, NY, USA) for 5 days. Dried samples were weighted then ground to a fine powder using a ball mill (CEPI SODEMI CB2200, Cergy, France).

8.2.4. NSC analysis

The NSC consisted in the sum of soluble sugars (SS) and starch. Soluble sugars were extracted from 10 mg of plant tissue powder mixed with 1 mL 80% aqueous ethanol (v/v). The mixture was incubated in a water bath at 80°C for 30 min and then centrifuged for 10 min at $10.000g$. The supernatant containing the soluble sugars was collected in a tube and the extraction of the SS on the pellet was repeated twice. The three supernatants were pooled and dried into a vacuum evaporator for 10 hours then resolubilized in 1 mL of ultrapure water. The starch contained in the pellet was hydrolyzed in glucose with amyloglucosidase (SIGMA-A7420) with citrate buffer at $\text{pH}=4.6$. The concentrations of SS and starch were measured using a modified anthrone method (Hansen and Moller, 1975). Starch and SS concentrations were determined spectrophotometrically at 620 nm in the presence of anthrone-sulfuric acid reagent and using glucose as standard. The sum of SS and starch (NSC) per organ was expressed in g of glucose per 100g of dry matter. The NSC concentration ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ Dry Matter) for each organ is defined as

$$[NSC] = \frac{\left[\frac{C_{\text{spectro}} * V_{\text{tot}} * V_{\text{sam}} * 10 * 100}{DM} \right]}{1000} \quad (27)$$

The NSC quantity (g) for aerial parts (trunk and branches) is defined as

$$NSC_{\text{quantity}} = \frac{[NSC] * DM}{100} \quad (28)$$

Where C_{spectro} is the glucose concentration read on spectrophotometer, V_{tot} and V_{sam} are the total volume and the sample volume respectively, DM is the dry weight of the sample. Roots was excluded for the NSC quantity calculation because we were not able to excavate all the roots and to assess the total DM of this organ.

8.2.5. Statistics

We used general linear mixed-effect models to study seasonal pattern of predawn water potentials from 2014 to 2016. We included treatment and date of sampling as explanatory fixed factors and predawn leaf water potentials as a responses variable. Individual trees were modeled as a random factor. Similar general linear mixed-effect models were used to study the growth of trees where individual trees as set as random factor. We also used general linear mixed-effect models to assess the effect of treatment on NSC concentrations. If distribution was not normally distributed, a logarithmic transformation was used. Normality and homoscedasticity of standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-vs-predicted plots. NSC quantity and dry biomass were analyzed also using general linear mixed-effect models. When a significant effect or interaction between effects were underlined, post-hoc tests were performed. Data were analyzed with the R software package (<http://www.r-project.org>, version 3.2.2, 2016-10-31). Values are presented as average \pm SE. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

8.3. Results

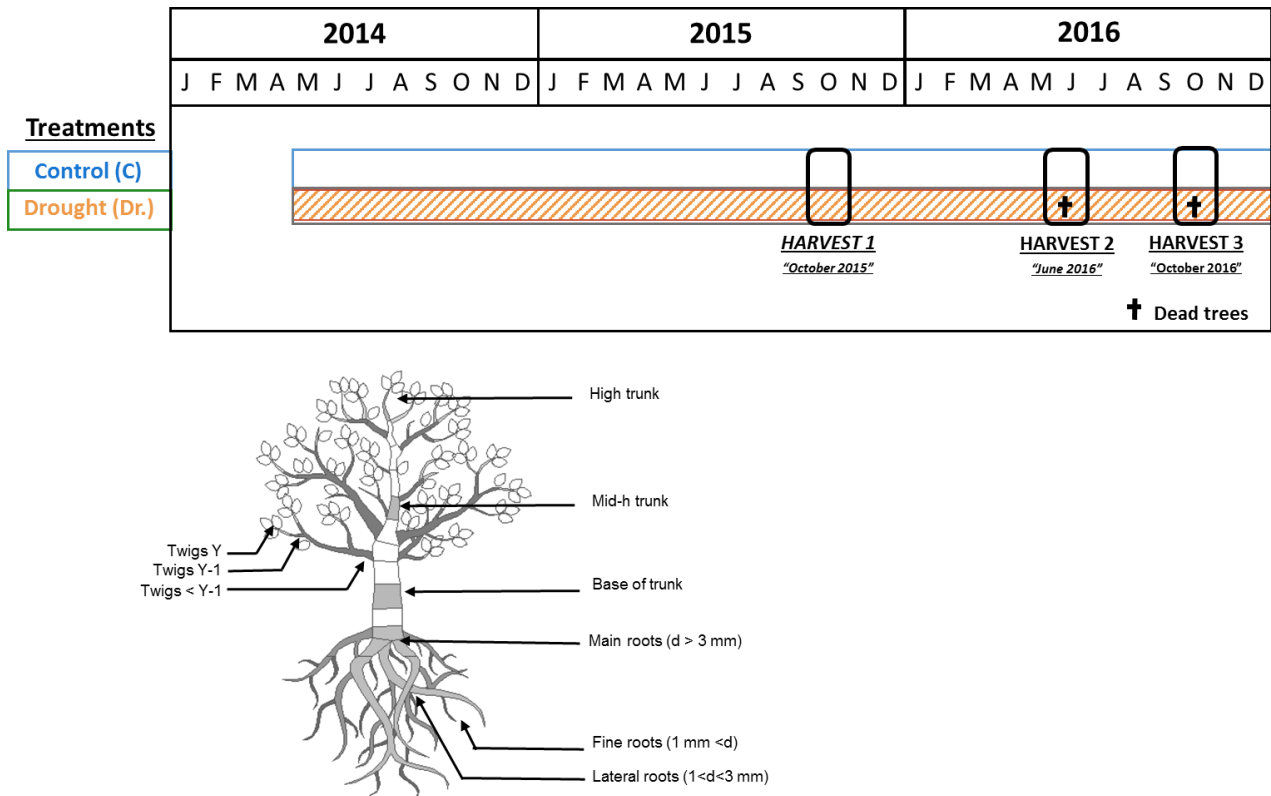


Figure VIII.1. Schedule of the experiment (top) since the onset of treatments in 2014. Dead trees were harvested in June and October 2016 while living trees were harvested in October 2015, June 2016 and October 2016. Schema (bottom left) of the sampled organs taken on each harvested tree. Twigs were taken as triplicate.

8.3.1. Soil and branch water monitoring

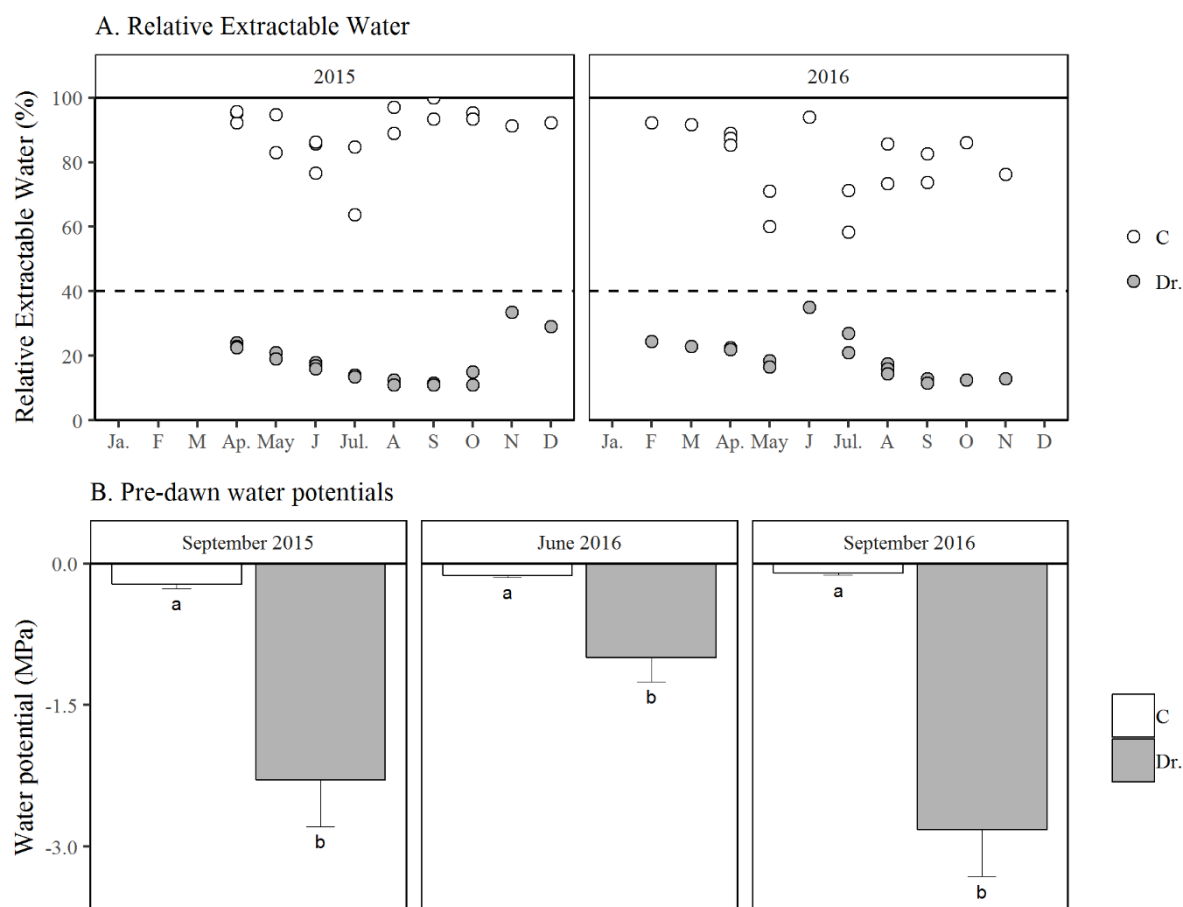


Figure VIII.2. Seasonal dynamics of the relative extractable soil water content (REW, A) and the average pre-dawn twigs water potentials (B) in 10-year-old beech trees during the year 2015 and 2016 under soil water deficit (Dr.) and irrigation (C). The dashed line indicate the threshold value of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al., (1999). Black arrows indicate the time when harvest were done. Different letters means a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date. Mean \pm SE, $n=6$ in October 2015 and June 2016 and $n=4$ in October 2016.

The seasonal monitoring of the relative extractable water (REW) in the soil showed a progressive increase in the soil water deficit parallel to a continuous decrease of REW during the two consecutive vegetative seasons in the drought treatment (Dr, **Figure VIII.2.A**). REW was below 40% for the duration of the experiment, whereas REW for irrigated control (C)

remained above 40%. As a result of progressive seasonal soil water depletion, pre-dawn water potential (ψ_{pd}) in twigs decrease from -2.3 MPa (September 2015) to -2.8 MPa (September 2016); ψ_{pd} of C always remained above -0.2 MPa (**Figure VIII.2.B**). During the time of the experiment, Dr. trees always showed significant lower pre-dawn twig water potentials than C trees.

8.3.2. Impact of drought on annual growth

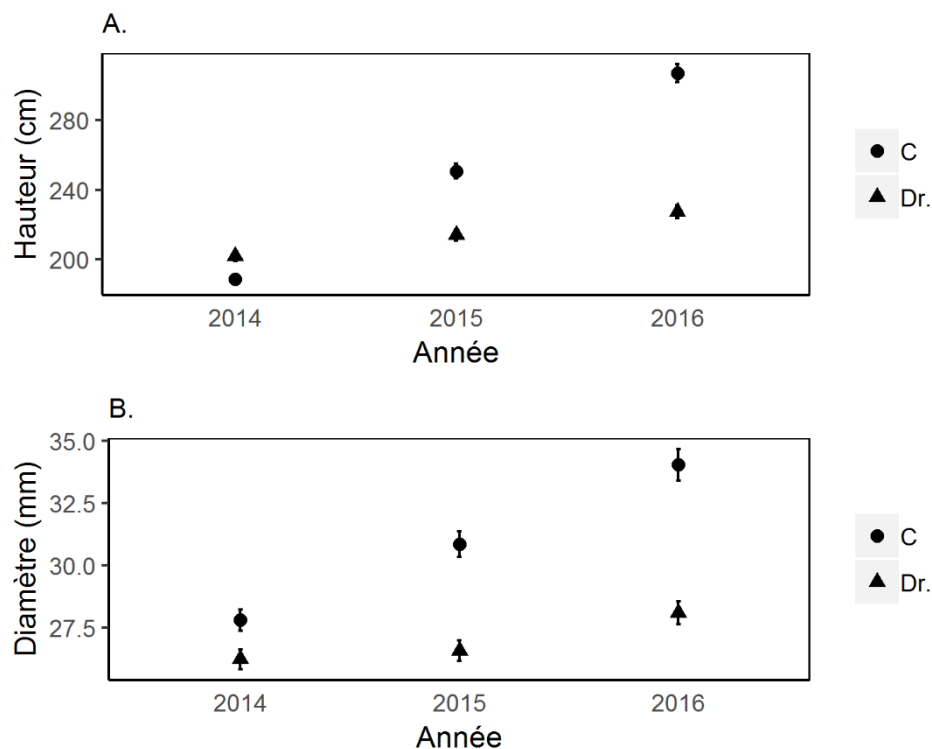


Figure VIII.3. Mean height (cm) and diameter (mm) of young-old beech trees under soil water deficit (Dr.) or normal irrigation (C). Mean \pm SE, $n=336$.

Trees under soil water deficit had lower diameter than control (**Figure VIII.3**) in 2014 ($p<0.001$), 2015 ($p<0.001$) and 2016 ($p<0.001$) while the height of trees under soil water deficit was lower in 2015 ($p<0.001$) and 2016 ($p<0.001$). An effect of the « time » for a given treatment (e.g between 2014 and 2016) was found in C trees and Dr. trees ($p<0.001$). The effect of time was as stronger as for diameter in C and Dr trees ($p<0.001$).

8.3.3. Impact of drought on tree survival

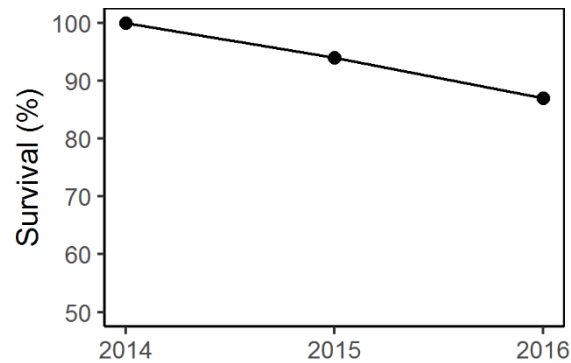


Figure VIII.4. Dynamic of tree survival in the soil water deficit treatment during the three years of the experiment. The control treatment presented no mortality. N=336.

At the end of each vegetative season of the experiment, we calculated the survival rate (**Figure VIII.4**). No mortality was recorded in the control treatment whereas 15% of trees under drought were dead at the end of the vegetative season in 2016.

8.3.4. Impact of drought on NSC concentration in several organs of above and belowground.

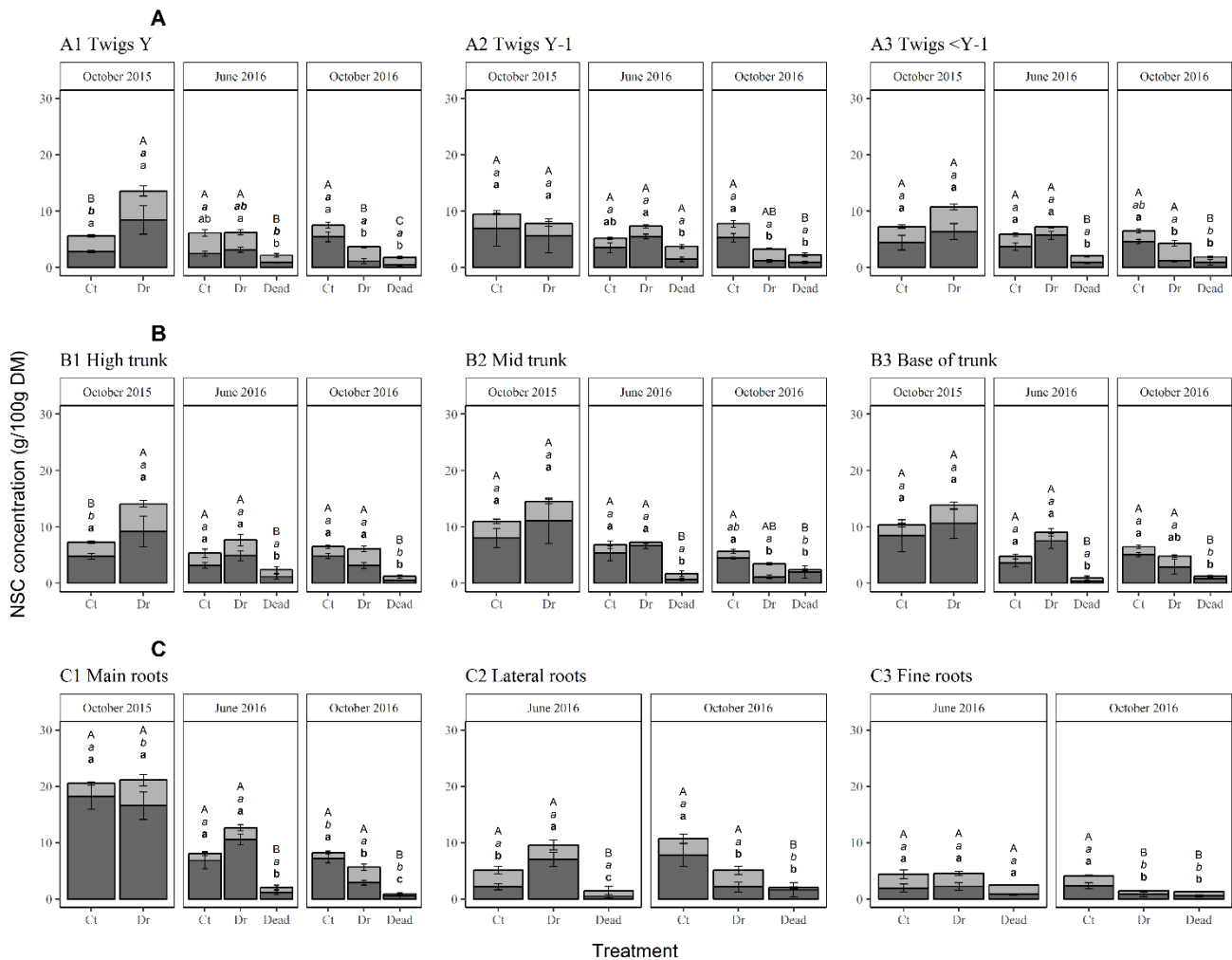


Figure VIII.5. Mean concentrations ($\text{g. } 100\text{g}^{-1} \text{ DM}$) of Non Structural Carbohydrates (NSC) in branches (A, twigs Y, twigs Y-1, twigs <Y-1), trunk (B, High Trunk, Mid-h Trunk, Base Trunk) and roots (C, Main roots, Lateral roots, Fine roots) in drought (Dr) and control trees (Ct). Dead trees were also sampled in June and October 2016 when mortality was recorded. Starch concentrations are in dark grey and soluble sugar concentrations are in light grey. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given organ. Differences between starch concentrations are given in the lower line in lowercase letters whilst differences in soluble sugar concentrations are in the middle line in *italic* letters. Differences in NSC between treatments are given in the upper line in uppercase bold letters. $n=6$ each for Ct and Dr trees in October 2015 and June 2016 and $n=4$ in October 2016. Six dead trees (trees which presented no budburst in spring 2016) were sampled in June 2016 and four trees in October 2016 (trees which died suddenly during the growing season in 2016).

In October 2015, 18 months after the onset of the drought treatment, when the seasonal stocks of C reserves are typically at their maximal level in trees, only a slight difference in NSC

concentrations was observed between treatments (*Figure VIII.5*). The Dr trees had significantly higher NSC concentrations than the Ct trees in two compartments: the youngest twigs (Twigs Y) and the higher part of the trunk (High Trunk) with NSC values of respectively 5.63% and 7.27% in Ct trees, and of respectively 13.6% and 14.1% in Dr trees (Fig. 4). For these two compartments, the NSC concentrations of the Dr trees differed from the Ct trees by 196% and 90%, respectively (*Figure VIII.6*). These two compartments plus Main Root presented also significantly higher SS values in the Dr trees than in the Ct (from 4.91% to 5.1% in Dr trees and from 2.47% to 2.8% in the Ct trees). For starch, no difference was observed between treatments.

Six months later, in June 2016, when the stocks of C reserves were minimal, the soil water deficit caused no significant differences in NSC concentrations compared to Ct trees whatever the compartment. SS and starch concentrations were also similar between Ct and Dr trees except in Lateral roots for starch (2.17% for Ct and 7.02% for Dr). Contrariwise, the dead trees presented very low NSC concentrations in all compartments (between 0.91 in the Base of Trunk compartment and 2.16% in the Twigs Y compartment, Fig 4). They presented significantly lower NSC concentrations than the Ct trees and the Dr trees in all compartments except for Twigs Y-1. The difference ranged from -57% for Twigs Y-1 to -89% for the base of the trunk compared to Ct trees (*Figure VIII.6*). In the dead trees, significantly lower starch concentrations than in the Ct trees were measured in all compartments except for Twigs Y and Twigs Y-1 (*Figure VIII.5*). Starch concentration values ranged from 1.9% to 6.8% in the Ct trees, from 2.26% to 10.6% in the Dr trees and from 0.39% to 1.47% in the dead trees (*Figure VIII.5*). Dead trees had significantly lower SS concentrations than Ct trees only in Twigs Y (3.67% and 1.27%, respectively).

Finally, in October 2016, after three years of drought, when the stocks of C reserves were at maximal levels in the trees, NSC concentrations were similar to the ones in October 2015 in the Ct treatment (mean of 10.21% in 2015 and 8.04% in 2016) whereas they had strongly decreased in the Dr treatment (mean of 13.7% in 2015 and 4.2% in 2016) for all compartments. The drought decreased the NSC concentrations between -42% and -79%, depending on the compartment, compared to the Ct treatment (*Figure VIII.6*). Starch concentrations were significantly lower in the Dr trees than in the Ct trees for all compartments except for High Trunk and Base of Trunk where values were similar. For SS concentrations, significantly higher values were observed in the Dr trees compared to the Ct trees in Main Roots whereas lower values were observed in Fine Roots and similar values were found in all other compartments.

Dead trees had lower NSC concentrations than both Ct and Dr trees. These differences were significant for all compartments between dead and Ct trees and for all compartments except Twigs Y, Mid-Trunk, Base of Trunk and Fine Roots between dead and Dr trees (*Figure VIII.5*). A deviation ranging from -55% to -92% was observed between dead and Ct trees (*Figure VIII.6*). A reduction in both starch and SS concentrations was observed in the dead trees compared to Ct trees in all compartments for starch and excepted in Mid-Trunk and all twigs for SS. SS in the dead trees were lower than in the Dr trees in all compartments except for Twigs Y-1 and Fine Roots.

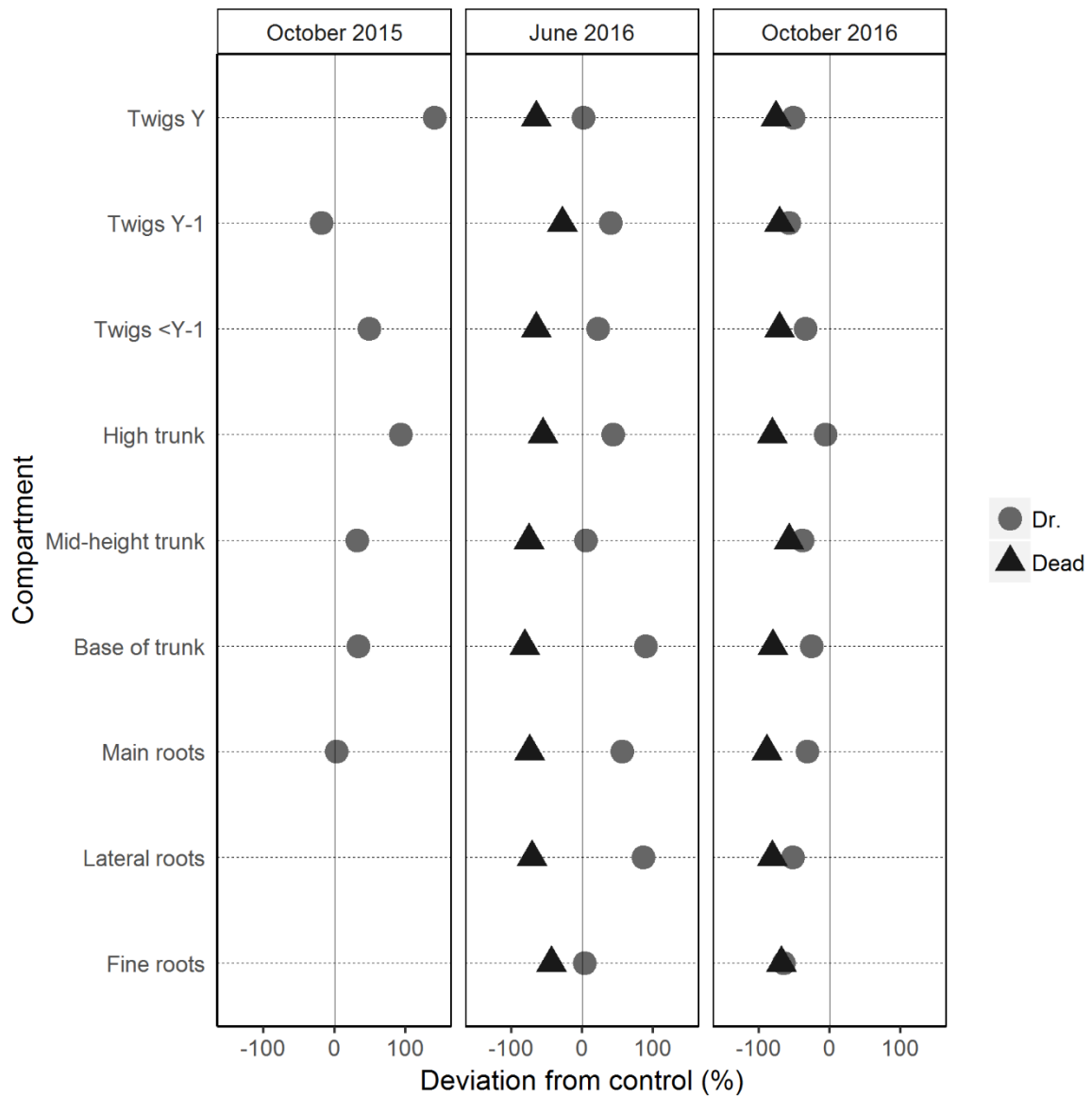


Figure VIII.6. Deviations (%) from control trees of NSC concentrations in drought and dead trees.

8.3.5. Impact of drought on biomass and NSC quantity in aboveground organs.

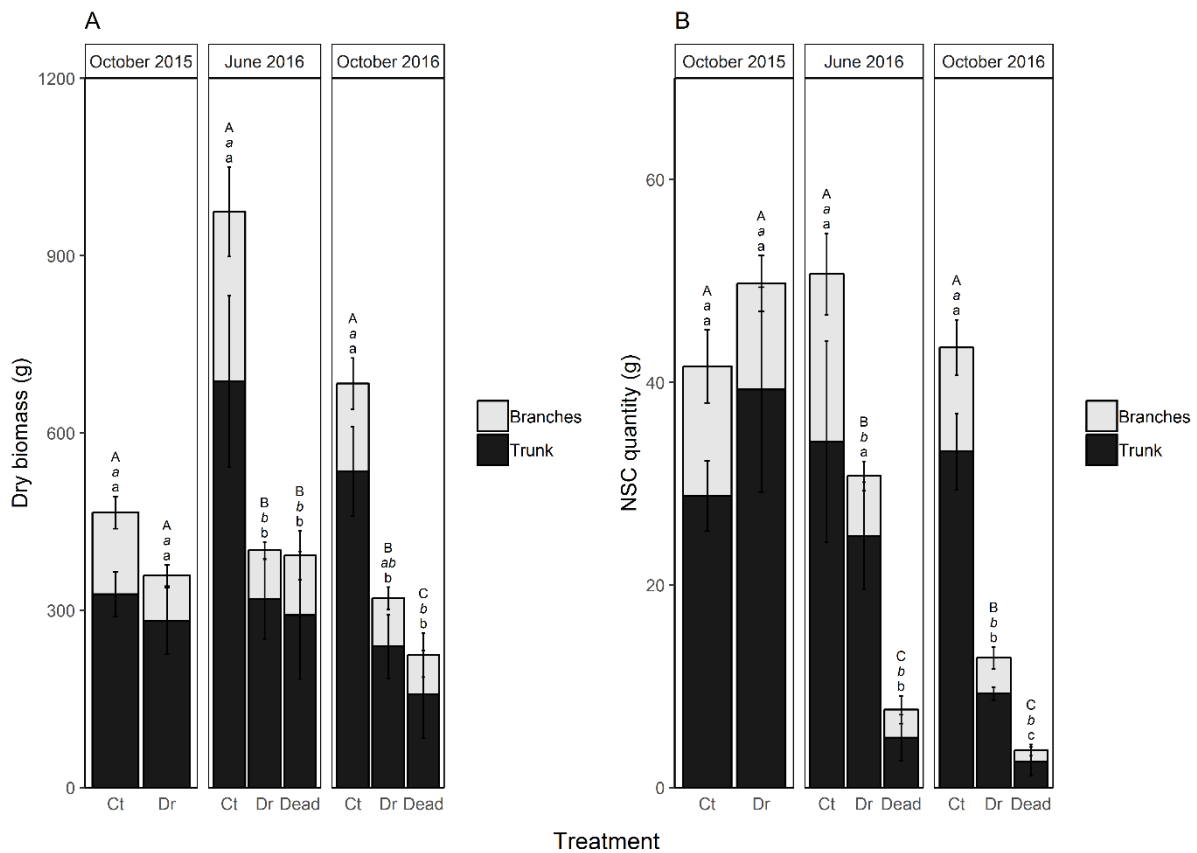


Figure VIII.7. Dry biomass (A, g) and nonstructural carbohydrate (b, NSC, g) and content in branches and trunks of drought (Dr) or control (Ct) trees. Dead trees were sampled in June and October 2016. Uppercase letters indicate differences between treatments for total NSC or biomass, middle lowercase letters indicate differences between values for branches, and lowercase letters at the bottom indicate differences for trunk values only. $n=6$ each for Ct and Dr trees in October 2015 and June 2016; $n=4$ in October 2016. Six dead trees (trees which presented no budburst) were sampled in June 2016 and four (trees which suddenly died during the growing season in 2016) in October 2016. Differences are significant at $p<0.05$.

The biomass in aboveground organs (trunk and branches) was compared between treatments at the three sampling dates (**Figure VIII.7.A**). In October 2015, the branch, trunk and total aboveground biomass and NSC quantities were similar in the Ct and Dr trees (**Figure VIII.7.A, B**). In June 2016, Dr and dead trees had significantly less trunk, branch and total aboveground

biomass than Ct trees (*Figure VIII.7.A*), which is coherent with the increasing impact on growth of the continuing drought. No significant difference in NSC quantity was noticed between Dr and Ct trunks while the NSC quantity in Dr branches was significantly lower (-65%) than in Ct branches (*Figure VIII.7.B*). Dead trees had lower NSC quantities in all compartments (-85%) compared to Ct trees. Finally, by October 2016, soil water deficit had decreased both trunk (-55%) and whole aboveground biomass in the Dr trees (-55% compared to the Ct trees), but branch biomass was the same. Dead trees had lower branch (-55%), trunk (-70%) and total aboveground biomass (-68%) than Ct trees (Fig. 5A). Dr trees had lower NSC quantities in the branch (-65%), trunk (-73%) and total aboveground (-70%) compartments compared to Ct trees (*Figure VIII.7.B*). Dead trees had significantly lower quantities of NSC in the trunk (-93% compared to Ct trees), branches (-90%) and total aboveground biomass (-91%) than Ct trees and Dr trees.

8.4. Discussion

8.4.1. Importance of storage and remobilization processes in beech trees for surviving during several years of drastic constraints

Enhance tree mortality was one of our primary objective as well as to know more about the importance of carbon storage on the processes involved in the death of a tree. We succeeded to enhance mortality in our study and survival times since the onset of drought treatment varied among individual trees from 400 to 900 days, corresponding to two or three consecutive vegetative seasons. It is interesting to note that thirty months of severe soil water deficit treatment, only 15% of beech trees died. This result highlights the high tolerance of *Fagus Sylvatica* L. to extreme drought which was also underlined by other studies (Tegel *et al.*, 2014, Hentschel *et al.*, 2016). Paradoxaly, *Fagus sylvatica* L. is also highly sensitive to drought in term of stem growth which is a common response of isohydric species (Bigler and Veblen, 2009, Voltas *et al.*, 2013, Hentschel *et al.*, 2014) and as a consequence of the soil water deficit, in our experiment, trees exhibited both secondary and overall primary stem growth reduction.

As carbon assimilation was diminished (D.Epron, personnal communication), the production of new photosynthetates should be greatly reduced. However, even if growth was also inhibited, others C sinks should be still active (*e.g* respiration, defense or export) or even upregulated (*e.g.* osmoregulation or hydraulic integrity). Stored C compounds had to be fundamental as only source of fuel for these C sinks. Through the regulation (active or passive, still under debate) of storage processes during the 18 month following the onset of drought treatment, NSC quantity were similar between droughted trees and well-watered trees (October 2015). Increase of NSC concentrations following drought is usually observed as the probable consequence of asynchrony between the cessation of growth and photosynthesis but in our study, we can hypothesize that this increase was surpassed by the need of soluble sugars for others metabolics demands. For example, in 2015, on the same experiment, phloem transport has been measured through foliar ¹³C labelling (Dannoura *et al.*, 2018). The main result of this study was that phloem transport was decrease due to soil water deficit. However, phloem transport and NSC are linked due to the need of soluble sugars which allows turgor pressure in transport tissue. Consequently, the balance between the cessation of growth and the need of soluble sugars for metabolic demands led to similar NSC quantity at the end of second vegetation season under drought.

Moreover, time have to be taken into account when interpreting C dynamics of trees under stress (Sala *et al.*, 2012). Later during the drought experiment, NSC concentration was rather stable or even was increased by drought compared to C during 24 month, then NSC declined in drought treatment after 30 months. This suggests that the ability to maintain NSC reserves was lost under a prolonged severe water constraint. We can make the hypothesis that metabolic demand for osmoregulation or maintenance respiration was the main driver leading to a decrease of NSC quantity (Duan *et al.*, 2013; Deslauriers *et al.*, 2014). Through the increase of soluble sugars concentrations combined to the decrease of starch concentration on Dr. trees, we can hypothesize that possible interconversions from starch to soluble sugars occurred. Our results are consistent with this view that NSC could be used in others ways than for growth or maintenance functions, for example to regulate osmotic balance and maintain water potentials. According to the results found in our study, it seems that time since the beginning of the drought onset was an important factor of survival. Indeed, at the end of the third vegetative season, starch concentration were lower in all organs on tree under drought treatment whereas control trees had higher starch concentrations. However, our study highlight also the importance of root compartment as still high NSC concentration has been found. Indeed, root is a key organ with the contribution of N uptake, C exudation and H₂O uptake. Metabolic active organs (*e.g* twigs and fine roots) displayed higher seasonal dynamics than trunk and roots. Roots and trunks are the two main organ of storage of C compounds but local use can decrease the transport cost associated. However, at the end of the experimentation and after 30 month of soil water deficit, NSC concentration was decreased in all organs including roots and trunk indicating that under longer drought, these organs are crucial for survival capacity.

The likely cascade of responses occurring in our drought-exposed living trees might be: (1) limited C assimilation and conductance, which (2) limited growth and, with that the production of new leaves and possibly fine roots tissues; (3) as trees reduce their growth, photoassimilated C were initially redirected to accumulate in perennial tissues in stems and roots but (4) the need to fuel osmotic balance as well as vital metabolic demand (*e.g* maintenance respiration, transport), lead to an overall decrease of NSC. Even if our experiment displays that beech trees is a drought tolerant species with only 15% of trees under soil-water deficit died, we have to ask why some trees survive while others succumbed.

8.4.2. But trees might die from a lack of carbon availability

In our study, in the third year of drought, dead beech trees reduces their carbohydrates resources but never until 0 at dying stage. Reduction to zero NSC seems highly unlikely (McDowell, 2011; Hartmann, 2013) but determining what can be the threshold of NSC exhaustion need more investigation. In our study, both starch and soluble sugars depletion was observed in the whole tree organs of dead trees instead of some organs suggesting either a local uses of soluble sugars or an efficient transport of sugars from perennial organs to photosynthetic tissue before dying. As the transport through phloem was diminished under drought but still active, so, we can be more confident that both local consumption of sugars to maintain turgor pressure for transport and osmoregulation were predominant. At the time of death, NSC forms was mainly into soluble sugars but starch concentration was not at zero indicating that potential interconversion from starch to soluble sugars was no longer possible when soil desiccation became longer and harsher. The hydrolysis of starch through the enzymatic activity require amount of water and under severe soil water deficit, hydraulic failure can also occur locally leading to an incapacity of interconversion. Indeed, C depletion may be also correlated with hydraulic dysfunction (Sevanto, 2014; Aguadé *et al.*, 2015; Gaylord *et al.*, 2015; Serrana *et al.*, 2015) because soluble sugars play a key role in osmotic adjustment, possible embolism refilling and root system growth (Gieger and Thomas, 2002; Sala *et al.*, 2012). So, C depletion can exacerbate hydraulic dysfunction and reciprocally because starch could be blocked in its reservoir and thus not be available for tree metabolism due to embolism (Sala *et al.*, 2012; Sevanto *et al.*, 2014). Embolism of vessels might occur also in our study. Moreover, the need of water and carbon can be exharcerbed when drought become longer and harsher. At the cellular level, both lack of carbon and lack of turgor can be fatal for cellular structure, integrity and metabolism (McDowell *et al.*, 2011). At the whole tree level, vascular transport should be a priority because if transport fails irreversibly, then whole-plant function fails.

The genus *Fagus Sylvatica L.* is an interesting case for studying mortality because of its economic value but also because of its own internal properties. This drought sensitive species has generally small vessels as described in previous studies and, consequently, may less vulnerable to embolism (Gasson, 1987; Hacke and Sauter, 1996; Barbaroux and Bréda, 2002). Both NSC pools and hydraulic capacities can explain the small number of trees which died during our drought experiment. However, this little number of tree which died from severe soil water deficit could be explained also because we did not account for one of the main hazards threatening forest ecosystem. Indeed, biotic agents may either make trees more susceptible to

mortality by weakening the trees before drought or by accelerating an ongoing decline process and eventually kill already weakened trees (Zweifel *et al.*, 2012; Gaylord *et al.*, 2013; Oliva *et al.*, 2014). Studies have shown that experimental drought stimulated attack on pinyon pine and Norway spruce (Gaylord *et al.*, 2013; Netherer *et al.*, 2015). Nevertheless, in our study, we demonstrated a lot of caution for the prevention to any pathogen attack and made some sanitary treatment when necessary, which happened one time in 2015. However, we can be assured that NSC availability was a driver of tree mortality in our study as very low quantity of NSC were found in dead trees but without excluding others mechanisms such internal nutrient deficiency or hydraulic failure. Finally, the answer of “what was the driver leading to death for 15% of trees under drought” and “why 85% of trees survived under such a long drought” is quite challenging and genetic approaches may be necessary to understand such variability (Moran *et al.*, 2017).

8.5. Conclusion

Our study highlight the capacity of beech trees to survive to a long and extreme soil water deficit. Such survival capacities was made to a strong capacity to remobilize ressources from all parts of trees. However, a small part of trees in our study died from soil water deficit and we emphasize that carbon starvation is highly unlikely to occur. More than quantity, availability of stored NSC should be fundamental to ensure survival of beech trees.

CHAPITRE 9:

RETOUR D'EXPERIENCE, DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

9.1. Retour d'expérience sur le dispositif expérimental

La mise en place d'un système d'exclusion de pluie de 630 m² effectuée avant le début de ce travail de thèse fut une étape ambitieuse permettant l'homogénéisation des conditions climatiques sur l'ensemble des arbres du dispositif. L'installation d'une bâche souterraine imperméable autour des arbres du traitement de sécheresse a permis d'éviter toute infiltration d'eau au niveau souterrain et toute prospection racinaire vers les traitements irrigués. Par des mesures régulières à l'aide d'une sonde à neutrons, l'humidité du sol a été suivie et l'irrigation a été ajustée finement afin de ne pas créer de stress édaphique dans les traitements de défoliation et témoin. Dans le traitement sec, la teneur en eau du sol a atteint rapidement après l'installation du dispositif le seuil de 40% correspondant au seuil au-dessous duquel une fermeture stomatique est engendrée afin de minimiser les pertes en eau (Granier *et al.*, 1999). Ce seuil de 40% n'a ensuite jamais été dépassé au cours des 30 mois d'expérimentation, ce qui était un des objectifs méthodologiques initiaux (**Figure IX.1**).

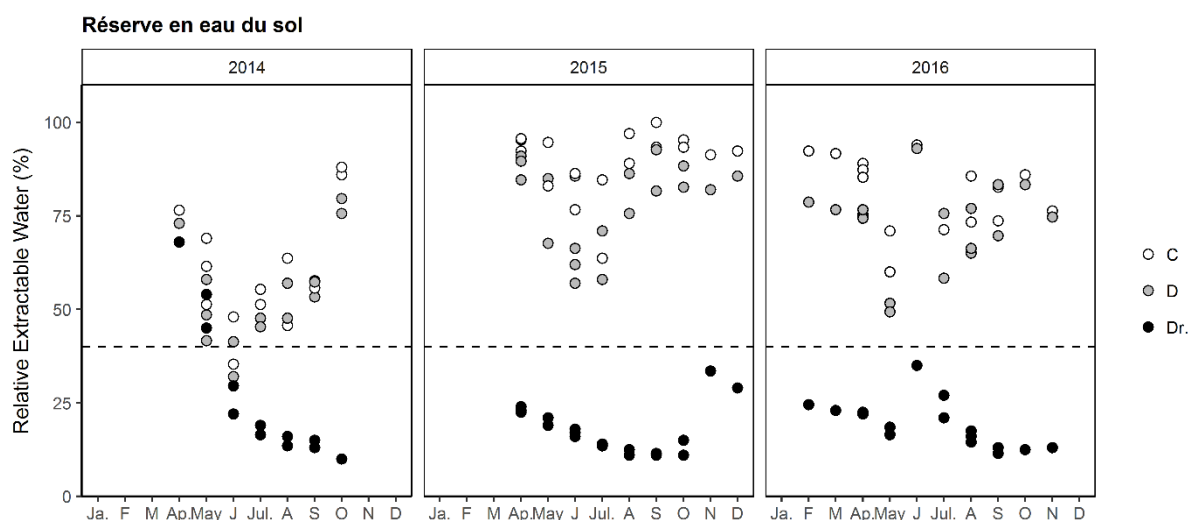


Figure IX.1. Evolution de la réserve en eau du sol durant toute l'expérimentation qui a débuté en Mai 2014 pour s'achever en Décembre 2016.

Néanmoins, due à une entrée d'eau latérale les jours de pluie, une hétérogénéité du niveau de sécheresse subi par les arbres de ce traitement a été détectée ce qui nous a amenés à caractériser individuellement le niveau de sécheresse par des mesures régulières de potentiels de base sur l'ensemble des arbres de ce traitement. Ces apports d'eau de pluies latérales ont probablement pu légèrement humidifier le sol au moins dans les premiers horizons, l'eau de pluie tombée sur les feuilles et ruisselant sur le sol a certainement été vite absorbée. Une variabilité de l'état hydrique des arbres a été confirmée par nos campagnes de mesures de potentiels de base

(mesures sur l'ensemble des arbres du traitement sécheresse, n=336, tous les mois pendant la saison de végétation).



Figure IX.2. Photographie de l'expérimentation mettant en évidence les différents traitements et schématisation de l'entrée d'eau latérale (Crédit photo : C.Massonnet).

Cette variabilité nous a permis d'étudier des états hydriques différents avec la distinction d'arbres en état de stress hydrique modéré (MD) ou intense (SD) basée sur les valeurs de potentiels de base de rameaux. Néanmoins, cette distinction n'a pas été prise en compte systématiquement sur l'ensemble des expérimentations mises en œuvre dans ce travail de thèse. En effet, selon l'expérimentation, cette distinction entre état de stress hydrique modéré ou intense n'a pas forcément eu de sens d'un point de vue statistique, car aucune différence significative entre arbres MD et SD n'était notée (**Chapitre V et VIII**). Dans ce cas l'ensemble des arbres MD et SD a été considéré comme faisant partie d'un même traitement sec. L'expérience faite sur un temps court comme les deux marquages foliaires des branches faits au printemps et en été 2015 ont permis d'avoir cette distinction entre les deux « intensités de sécheresse ». Cette distinction a également été faite dans l'expérimentation de marquage d'arbre entier: nous avons choisi au moment du marquage, des arbres avec un statut hydrique différent en fonction des mesures de potentiels de base faites quelques jours avant le marquage.

La seconde contrainte appliquée dans notre étude a été une défoliation annuelle effectuée en Juin 2014 et 2015 et en Mai 2016. L'intensité de la défoliation fut de 75% du feuillage en 2014 et 2015 et de 90% en 2016. Le nombre d'arbres défoliés était conséquent (n=336), ce qui a amené à effectuer la défoliation pendant 2 semaines consécutives malgré l'aide de dizaines de personnes du centre de recherche Inra Grand-Est et la contribution de classes de collégiens de la région Grand-Est. Aussi, lors d'une expérimentation de défoliation aussi ambitieuse que celle-ci, il faut prendre en compte que le nombre de feuilles à enlever par arbre est très important et que sans l'aide de très nombreuses personnes, il n'aurait pas été possible de mener cette expérimentation jusqu'à son terme. Si la mise en place des traitements était ambitieuse, elle fut réussie de part d'importantes ressources financières et humaines. Si le premier avait été budgété, le second lui, a nécessité de développer des projets de sciences participatives (projets « Hêtre en Fête » et « Survivors »).

9.2. Discussion générale

9.2.1. Le hêtre répond rapidement à un déficit hydrique du sol

a. Un premier levier pour mitiger la perte en eau à court terme par la diminution de la croissance radiale

Suite à la mise en place de la contrainte hydrique, la croissance radiale de nos jeunes hêtres a été plus faible que celle des arbres du traitement témoin. Une croissance radiale réduite lors d'évènements de sécheresse est souvent observée (van der Werf *et al.*, 2007 ; Michelot *et al.*, 2012 ; Gérard et Bréda, 2012). Cependant ce n'est pas toujours le cas, une étude sur du Sapin noir a montré que ces arbres avaient des croissances plus fortes en situation de dépérissement que celles des arbres sains (Cailleret *et al.*, 2014). Néanmoins, le hêtre est sensible à la baisse de l'humidité du sol (Leuschner *et al.*, 2001 ; Granier *et al.*, 2008) et sa croissance répond très bien aux conditions climatiques de la saison de végétation en cours (Michelot *et al.*, 2012). La diminution de l'humidité en eau du sol peut imposer une limitation de la croissance via une perte de la pression de turgescence dans les cellules (Hsiao, 1973 ; Hsiao *et al.*, 1976). La croissance radiale est également affectée par la dynamique de réserve en eau dans l'arbre qui permet de modifier le potentiel hydrique du xylème et la pression de turgescence durant la phase d'accroissement cellulaire (Taiz et Zeiger, 1998 ; Turcotte *et al.*, 2011).

Les valeurs de REW et de potentiel hydrique mesurés au cours de notre expérimentation indiquent que nos jeunes hêtres ont été soumis à un stress hydrique intense. Le potentiel de base

raméal de nos arbres a chuté jusqu'à -3,2 MPa ce qui est plus bas que les potentiels de base rencontrés naturellement sur des hêtres adultes. En effet, durant la sécheresse de 2003, des valeurs de -2 MPa avaient été enregistrées (Bréda *et al.*, 2006).

b. Un second levier pour mitiger la perte en eau à moyen terme par la diminution de la surface foliaire

A moyen terme, une modification des propriétés foliaires a pu avoir lieu avec une baisse de la surface foliaire individuelle ainsi que du nombre de feuilles observée lors de la seconde saison de végétation (**Chapitre VII**). Ces modifications permettent également d'éviter une perte en eau trop importante, les arbres pouvant aussi moduler l'ouverture stomatique contrôlant les échanges gazeux à la surface de la feuille (Klein *et al.*, 2014). En évitant des pertes en eau trop importantes, les arbres évitent alors un dessèchement foliaire mais cela aura également comme conséquence de moins refroidir le compartiment foliaire, surtout si la température de la feuille excède la température atmosphérique (Bréda *et al.*, 2006). Aussi, en modulant sa croissance et sa morphologie foliaire, nos jeunes hêtres ont pu alors empêcher une diminution trop importante du potentiel hydrique en s'assurant alors que la demande en eau foliaire n'excède pas la quantité d'eau disponible, ce qui, le cas échéant, mènerait à l'embolie du système vasculaire et à une dessiccation complète (Martin-StPaul *et al.*, 2017).

Dans la cohorte des réponses possibles de nos jeunes hêtres, l'eau mise en réserve dans les tissus de l'arbre peut également aider à surmonter une sécheresse (Holbrook, 1995). En relâchant cette eau mise en réserve, les embolies peuvent être limitées en minimisant les contraintes de tension du xylème (Meinzer *et al.*, 2009 ; Manrique-alba *et al.*, 2018). La contribution de l'eau mise en réserve au sein de l'arbre sur le flux de transpiration est dépendante du déficit en eau du sol : plus la quantité en eau dans le sol est faible, et plus grande sera la contribution de ce réservoir (Hinckley et Bruckerhoff, 1975 ; Borchert, 1994 ; Goldstein *et al.*, 1998 ; Deslauriers *et al.*, 2007). Aussi, l'ensemble de ces réponses peuvent apporter des justifications sur la tolérance du hêtre à une contrainte extrême.

9.2.2. Le maintien d'un système de transport sous contrainte fondamentale pour la survie de l'arbre

a. Le système de transport phloémien

Le transport phloémien est basé sur l'hypothèse de Münch selon laquelle les hydrates de carbone nécessaires au métabolisme et à la mise en réserve sont transportés des organes sources

vers les organes puits en suivant des gradients de pression le long d'un conduit constitué de cellules criblées (Münch, 1930 ; Knoblauch et Peter, 2010). Le système de transport phloémien est constitué de trois facteurs, les sources, les puits et le système de transport. L'eau passant dans le phloème de manière osmotique est originaire des conduits du xylème, traduisant une forte interaction entre le transport phloémien et xylémien (Thorpe et Minchin, 1996 ; Hölttä *et al.*, 2009). Lors d'une sécheresse, le transport de solutés des sources vers les puits peut être grandement réduit soit par une trop grande hausse de la viscosité soit par une impossibilité de maintenir le statut hydrique du phloème et la pression de turgescence cellulaire (Sevanto, 2014).

b. La contribution des composés carbonés dans le maintien du système de transport phloémien.

En situation de limitation de la ressource carbonée comme lors d'une sécheresse où le hêtre ferme rapidement ses stomates, les réserves carbonées auront alors une grande importance dans le maintien du système de transport (Tanner et Beevers, 2001 ; Sevanto *et al.*, 2013). Il a été ainsi montré que tant que les réserves carbonées peuvent être utilisées, un arrêt complet du système de transport phloémien ne semble pas possible (Sevanto *et al.*, 2013), ce qui est cohérent avec nos résultats d'estimation des stocks complets de réserves carbonées dans l'arbre (**Chapitre VIII**).

Nos jeunes hêtres ont présenté des baisses de la vitesse de transport du phloème. En effet, une autre équipe au sein du même projet que cette thèse a montré que les arbres avec des potentiels hydriques de base les plus bas présentaient des vitesses de transport phloémien réduites (Dannoura *et al.*, 2018), ce qui rejoint une partie des conclusions que nous avons obtenues après la mesure du transport du marqueur foliaire à longue distance (**Chapitre VI**). Ces résultats suggèrent une baisse de la vitesse de transport de solutés dans l'arbre mais que, néanmoins, le transport est toujours fonctionnel.

c. Le maintien du transport de solutés permis par l'ajustement de la croissance radiale et foliaire ?

Sous sécheresse, la baisse conjointe des coûts carbonés pour la croissance radiale et pour la mise en place du compartiment foliaire pourrait alors constituer une stratégie afin de satisfaire les besoins accrus en solutés nécessaires pour garder un transport phloémien fonctionnel. Aussi, les quantités de composés de réserves carbonées similaires entre les arbres bien irrigués et non irrigués retrouvées après deux saisons de végétation consécutive (**Chapitre VIII**) sous sécheresse apparaîtraient alors comme un équilibre entre des besoins réduits pour la croissance

et le compartiment foliaire et des besoins augmentés pour le transport phloèmien mais également pour garantir l'intégrité des cellules.

9.2.3. Une stratégie de gestion locale des ressources ayant ses limites.

a. Une gestion de ressources carbonées et azotées au niveau local

Un stockage proche des organes en croissance peut être une stratégie pour minimiser les coûts associés à la remobilisation. En effet, que ce soit sous contrainte ou limitation via une défoliation ou une sécheresse, le compartiment foliaire est toujours privilégié, que ce soit pour le maintien de l'appareil photosynthétique ou comme une stratégie de mise en réserve locale de l'azote (**Chapitre VI et VII**). Cette stratégie d'allouer l'azote, une des ressources les plus limitantes pour la croissance (Rennenberg *et al.*, 2009), dans le compartiment foliaire peut être interprété comme une stratégie opportuniste où l'assimilation carbonée, qui est dépendante des protéines foliaires, pourrait être rapidement reprise en cas de condition hydrique plus favorable. En effet, même sous conditions de bonne irrigation, nos résultats suggèrent que la reprise de la photosynthèse est priorisée comme lors d'un événement de défoliation où l'allocation azotée aux protéines est augmentée passant de 40% à 70% (**Chapitre VI**).

Nous avons pu également montrer que lors d'un événement de sécheresse, le compartiment racinaire est important comme indiqué par les concentrations importantes de composés carbonés trouvés après 24 mois de contrainte hydrique. Garder une allocation aux racines permet de minimiser les coûts de transport pour la mise en place de nouvelles racines fines (Jackson *et al.*, 1997 ; McCormack *et al.*, 2015). La durée de vie des racines fines peut varier entre espèces et peut se compter en mois ou en années (Coleman *et al.*, 2000 ; Withington *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2016) mais cette durée de vie est très dépendante de l'environnement (Peek, 2007 ; Watson *et al.*, 2000) comme la disponibilité en azote (Adams *et al.*, 2012 ; McCormack et Guo, 2014) ou l'humidité du sol (Anderson *et al.*, 2003 ; Green *et al.*, 2005). Une telle stratégie de garder des ressources mises en réserve proche du lieu de production de ces racines fines pourrait améliorer la compétitivité du hêtre lors d'une augmentation de la disponibilité des ressources dans le sol.

b. La gestion des ressources au niveau raméal apparaît comme essentiel au fonctionnement de l'arbre

A première vue, il apparaîtrait « dangereux » pour l'arbre de remobiliser une grande partie de ses réserves azotées dans le compartiment foliaire car une réponse de l'arbre à une sécheresse

peut être une perte foliaire (Galvez *et al.*, 2011 ; Ryan, 2011). Il apparaît alors que le maintien de la photosynthèse est une priorité pour le hêtre. En gardant une partie de ces composés carbonés et azotés proche des régions métaboliquement actives que sont les branches et les feuilles, la capacité de survie de l'arbre pourrait être augmentée. En effet, la croissance printanière et l'établissement de nouvelles feuilles sont très coûteux (Barbaroux et Bréda, 2002) et, par conséquent, chercher à la maintenir et à éviter le dessèchement pourrait devenir fondamental pour assurer la survie de l'individu. A des potentiels hydriques au niveau raméal si faibles que ceux retrouvés dans notre étude, la baisse de conductivité des branches de hêtre devait être très forte (de 35 à 100%) (Cochard *et al.*, 1999 ; Lemoine *et al.*, 2002). Aussi, le fait de maintenir des concentrations élevées en composés carbonés et azotés dans les feuilles ou dans les organes proches (rameaux) peut aussi être la conséquence d'un besoin local pour garantir des pressions osmotiques pour le transport et donc de pouvoir remobiliser et transporter les composés carbonés et azotés.

c. L'autonomie des branches pourrait être perdue face à un stress long et intense

En effet, la proportion de sucres solubles trouvée en augmentation dans les rameaux des arbres secs (**Chapitre V**) et la part d'azote non allouée aux protéines (60%) (**Chapitre VI**) indiqueraient un besoin important pour des fonctions autres que pour le fonctionnement photosynthétique qui est réduit. Les branches fonctionnent généralement de manière autonome durant la saison de végétation (Watson et Casper, 1984 ; Sprugel *et al.*, 1991) et ne sont dépendantes du reste de l'arbre qu'au moment du débourrement. Néanmoins, on pourrait se questionner sur l'autonomie des branches sur le long-terme face à une sécheresse. En effet, nous avons pu déterminer qu'après 30 mois sous sécheresse (**Chapitre VIII**), les compartiments même éloignés et généralement peu concernés par la remobilisation (racines principales et tronc) semblent remobiliser leurs ressources. Là où 1 an en arrière, ces compartiments étaient concentrés en amidon et peu concentrés en sucres solubles reflétant leur rôle pour la mise en réserve, il fut trouvé l'inverse 1 an après. Aussi, il apparaîtrait que face à une sécheresse longue et intense, la demande en carbone est si forte qu'elle engendre une remobilisation carbonée soit à un niveau local pour assurer le bon fonctionnement du système de transport, soit à distance dans des organes métaboliquement plus « actifs » que sont les racines fines et les feuilles.

9.2.4. Des besoins métaboliques importants nécessitent une gestion des ressources sur le long terme

Dans le cycle de la vie de l'arbre lui permettant de survivre pendant des décennies, la mise en réserve est une composante fondamentale. Si sur le court terme, les besoins associés en carbone et azote peuvent être diminués via une diminution de la croissance et/ou de la morphologie foliaire, un cycle saisonnier efficace doit être réalisé en parallèle. Cette mise en réserve peut être particulièrement importante lorsque la ressource diminue lors d'une défoliation ou d'une sécheresse.

Nos résultats suggèrent que même sous une contrainte importante où la disponibilité des ressources azotée et carbonée est fortement réduite, la mise en réserve est maintenue, que ce soit au niveau local ou au niveau de l'individu. Aussi bien au niveau carboné qu'azoté, la baisse conjointe de la demande en substrat et l'absence de production de nouveaux composés via le compartiment racinaire ou foliaire a probablement provoqué un fonctionnement de l'arbre en « système fermé ». La seule source de composés carbonés et azotés disponible pour le fonctionnement métabolique deviendrait alors les réserves.

9.2.5. Une approche multifactorielle nécessaire pour évaluer l'impact d'une sécheresse ou d'une défoliation

L'impact d'une sécheresse sur l'état de santé de l'arbre est la résultante de ces 3 composantes : sa durée, son intensité et le moment dans la saison de végétation où elle intervient. De manière analogue, une défoliation pourra impacter un arbre selon 3 facteurs: l'intensité de la défoliation, sa récurrence et le moment dans la saison de végétation où elle intervient. Si durant les 24 premiers mois de contraintes, le hêtre semblait avoir mis en place une stratégie d'évitement de la sécheresse (fermeture stomatique, diminution de la surface foliaire) et de « tolérance » à la défoliation (augmentation de l'absorption azotée racinaire, augmentation de la part d'azote aux protéines foliaires afin de compenser la perte en azote foliaire), il semble que la troisième saison de végétation ait été l'amorce d'un basculement. La récurrence de la sécheresse a impacté la remobilisation printanière azotée tandis que la récurrence de la défoliation n'a pas eu d'impact sur cette même remobilisation (**Chapitre VII**).

Néanmoins, l'intensité, la récurrence et le moment dans la saison de végétation de la troisième défoliation ont pu avoir des conséquences sur la physiologie de l'arbre. En effet, en 2016, la défoliation a été avancée de deux semaines, son intensité a été augmentée de 75% à 90%, c'était la troisième défoliation consécutive et c'est cette même année que la croissance des arbres défeuillés a été diminuée. Cependant, il semblerait que suite à 3 défoliations d'intensité différente, le fonctionnement carboné d'une jeune branche ne soit toujours pas modifié

indiquant, peut-être, une allocation préférentielle vers la mise en réserve plutôt que vers la croissance comme on l'a observé en réponse à la sécheresse. Une allocation vers la mise en réserve au détriment de la croissance a déjà été évoquée et pourrait être une adaptation à la défoliation (Millard *et al.*, 2001 ; Hoch *et al.*, 2003). Comme le feuillage d'un arbre décidu peut être reformé entièrement jusqu'à 4 fois à partir des réserves carbonées (Hoch *et al.*, 2003), l'impact d'une défoliation partielle ne serait pas très importante en terme de conséquence pour sa survie. Des défoliations partielles sont le cas le plus commun dans les forêts tempérées (Kulman, 1971 ; Veblen *et al.*, 1996 ; Frelich, 2002) et les arbres décidus ont probablement su s'adapter à ces pertes foliaires (Piper et Fajardo, 2014). Enfin, une défoliation mise en place au début de l'autotrophie des nouvelles feuilles peut également avoir un impact sur la croissance de l'année.

Les contraintes appliquées dans notre étude ne semblent pas avoir été de la même « intensité » pour nos jeunes hêtres. En modulant rapidement sa croissance et son compartiment foliaire, le hêtre a rapidement réagi face à la contrainte hydrique tandis que les défoliations successives n'ont pas provoqué de changements morphologiques ou de perte de croissance. Néanmoins, nos résultats obtenus pour les arbres défeuillés sont à relativiser compte tenu du substrat de sol que l'on a utilisé, c'est-à-dire un ancien sol agricole avec un ratio C/N de 10 dans les premières couches de sol (J. Levillain, comm. pers.), c'est-à-dire bien plus bas que ce que l'on peut retrouver naturellement en forêt (C/N ratio \in [16 ; 44], Cools *et al.*, 2014). L'absorption azotée ne fut pas quantifiée dans notre étude mais nous pouvons postuler que celle-ci a pu être augmentée suite à la défoliation permettant de mitiger l'effet de la défoliation. Il aurait été alors intéressant de pouvoir suivre par marquage isotopique l'absorption azotée racinaire au moment de la défoliation afin de déterminer si l'augmentation de l'allocation azotée aux protéines foliaires provient d'une remobilisation des réserves azotées ou d'une plus grande absorption.

Un ratio C/N de 9,7, traduisant un substrat de sol plutôt fertile, a été retrouvé dans les premières couches du sol du traitement sec indiquant que ce n'est pas tant la quantité du substrat qui est limitante mais sa disponibilité. En effet, la croissance racinaire a été impactée par la sécheresse et, ceci, très rapidement après l'établissement de la contrainte hydrique (Joseph Levillain, comm. pers.).

9.2.6. Comment expliquer la résistance du hêtre

Le hêtre est une espèce dominante naturellement mais qui est perçue comme sensible à la sécheresse (Fotelli *et al.*, 2009). Dans notre étude, 336 jeunes hêtres ont été soumis à une contrainte de défoliation et après 3 défoliations annuelles consécutives, aucun arbre n'est mort. De plus, 336 autres jeunes hêtres ont, eux, été soumis à une sécheresse édaphique continue et intense pendant 30 mois. Sur ces 336 arbres, 15% sont morts. Par conséquent, 85% et 100% des arbres sous contrainte hydrique ou de défoliation ont résisté. Alors comment expliquer cette résistance ? Le principal facteur pouvant expliquer la mortalité d'un arbre est, aujourd'hui, une rupture complète de la colonne d'eau (Pittermann, 2010 ; Larter *et al.*, 2017). Afin d'éviter un tel événement de se produire, deux facteurs sont à prendre en compte qui sont les limites fonctionnelles du système vasculaire de l'arbre et sa capacité à maintenir le potentiel hydrique en dessous de ces limites fonctionnelles. Néanmoins, la réponse des arbres à un événement de mortalité est complexe (Choat *et al.*, 2018). La résistance hydraulique d'un arbre à une sécheresse est généralement donnée en fonction de son Ψ_{50} , valeur qui correspond à 50% de perte de la conductance hydraulique. Ces différences de vulnérabilité sont déterminées par l'anatomie du xylème, la porosité des membranes de ponctuation mais comme phloème et xylème sont interconnectés via des échanges latéraux (Sevanto, 2014), cette vulnérabilité est aussi dépendante de la disponibilité en hydrates de carbone non structuraux (NSC). Notre étude suggère que face à une sécheresse longue et intense, cette mise en réserve est maintenue mais chute après 30 mois de contrainte. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse qu'en préservant ses composés carbonés via une modulation des puits de carbone, le hêtre peut garantir un système de transport fonctionnel face à une contrainte. Ce système de transport est d'autant plus important qu'il permettrait au hêtre d'être compétitif si une réhydratation s'opérait. L'allocation priorisée vers les protéines foliaires pourrait indiquer une plasticité rapide de la réponse à une réhydratation par une reprise de l'assimilation carbonée rapide. Aussi, même en cas de quantité faible de composés carbonés disponibles et sous un transport de solutés qui est contraint, le hêtre n'est pas mort. Compte tenu de cette plasticité, il serait peut-être préférable de parler de Ψ_{88} que de Ψ_{50} lorsque l'on parle de mortalité chez le hêtre compte tenu de sa résistance à des sécheresses intenses à des potentiels hydriques très bas.

Une autre hypothèse de la résistance de nos jeunes hêtres est l'anatomie du xylème du hêtre avec des vaisseaux petits et en grand nombre lui conférant une vulnérabilité moindre à la cavitation par rapport à des espèces ayant de gros vaisseaux comme le chêne par exemple. Si notre étude montre la résistance du hêtre lorrain à deux contraintes majeures, la combinaison

des deux n'a pas été testée (défoliation x sécheresse). Or une défoliation peut accompagner une sécheresse longue et les conséquences pour la survie de l'arbre peuvent être grandes. Un sol nutritif comme celui usité dans notre étude peut aussi expliquer notre faible proportion de mortalité, la disponibilité en azote pouvant être reliée avec la capacité d'un arbre à survivre (Gessler *et al.*, 2016).

Néanmoins, cette résistance semble avoir une limite et la capacité d'un arbre à gérer ses ressources semblent primordiales. A la fin de l'expérimentation, la baisse des quantités de composés carbonés dans les organes pérennes semble indiquer une bascule. Si le maintien du statut hydrique de l'arbre a été, en partie, permis par la remobilisation de sucres solubles, ces ressources pourraient devenir plus que limitantes. On peut alors se questionner sur la capacité du hêtre à survivre à de longs et récurrents épisodes de sécheresse.

9.2.7. Comment nos arbres sont-ils morts ?

Quinze pourcents d'arbres morts n'est pas un résultat élevé après trois années de contraintes sévères mais ce phénomène est plus élevé qu'en conditions naturelles. Pourquoi certains arbres sont morts tandis que d'autres ont survécu était une des questions posées au début de ce manuscrit.

Les variables disponibles à l'heure de l'écriture de ce manuscrit sur nos arbres morts sont les données de la dynamique raméale, de la répartition des composés carbonés dans l'arbre, des données de croissance aérienne et des valeurs de potentiels de base. Comme la mort d'un organisme est sûrement la finalité de nombreux et complexes processus, une loi de Murphy pourrait s'appliquer. Une différence de conditions environnementales ou pédologiques ne peut pas expliquer la mort de certains arbres étant donné que l'ensemble des individus, morts ou vivants, ont poussé sur le même sol et sous des conditions environnementales identiques sous le toit. Les arbres morts n'ont pas subi d'attaques biotiques, n'étaient pas plus petits ou plus fins que leurs voisins, n'étaient pas situés en bordure d'expérimentation où ils auraient pu subir des dégâts liés au vent. Aussi, un mécanisme ou la combinaison de plusieurs mécanismes internes à l'arbre ont pu les faire mourir.

Nous avons déterminé les arbres morts en fonction d'une dégradation de la couleur de leur tronc et un assèchement subit de l'ensemble de leurs feuilles. Les arbres considérés comme morts à la date du printemps 2016 étaient constitués d'arbres qui n'ont pas débourré, aussi, nous pourrions être critiques envers le choix de ces arbres. Néanmoins, les arbres sélectionnés comme morts au printemps 2016 présentaient les mêmes caractéristiques d'un point de vue

carboné que ceux morts en octobre 2015 (prélèvements raméal) et 2016 (prélèvements raméal et abattage arbre entier).

Notre étude (**Chapitre VIII**) met en avant que la quantité de composés carbonés était très faible chez les arbres morts et ceci, dans tous les compartiments. Néanmoins, en regardant de plus près la composition de ces composés carbonés, nous montrons que ceux-ci sont surtout présents sous forme de sucres solubles dans les zones métaboliquement plus « actives » que sont les racines fines, les branches jeunes portant les feuilles et la partie haute du tronc. En parallèle, les composés carbonés restants dans le reste des compartiments étaient surtout sous forme d'amidon. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que sous une contrainte hydrique très forte, la demande métabolique est telle que pour subvenir à ces besoins, l'ensemble des composés carbonés non structuraux de l'arbre serait remobilisé, par la conversion d'amidon en sucres solubles jusqu'à un certain point où l'arbre ne peut plus les remobiliser. La conversion d'amidon en sucres solubles nécessite d'être dans un milieu aqueux et, par conséquent, des ruptures locales de la colonne hydraulique ont pu se produire rendant impossible la conversion d'amidon restant. Ces composés carbonés résiduels seraient séquestrés car il serait impossible de les remobiliser (Sala *et al.*, 2012). Néanmoins, d'autres variables sont nécessaires pour comprendre pourquoi certains arbres sont morts alors que d'autres non et l'apport futur des composés de réserves azotés pourront y contribuer.

9.3. Conclusions

En 2004, les médias publiaient des cartes (projet CARBOFOR) montrant l'évolution possible de la forêt française d'ici 2100. L'ensemble de la foresterie française prenait alors conscience des conséquences possibles des changements climatiques sur les écosystèmes forestiers français. Parmi les essences concernées, le hêtre, essence emblématique de la forêt française, serait susceptible de voir son aire de répartition régresser fortement vers le Nord-Est et les régions montagneuses. Néanmoins, si ces modèles simulent bien la présence du hêtre aujourd'hui, les simulations de déplacement de la niche des espèces à l'horizon 2100 reposent sur des hypothèses climatiques avec de fortes incertitudes. Mais comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, une meilleure connaissance des processus écologiques notamment la mortalité permettra d'avoir une vision plus réaliste de ce qui pourra se passer dans les écosystèmes forestiers sous l'influence des changements climatiques.

Ces outils vont permettre aux gestionnaires forestiers de prendre une décision qui impactera la production forestière dans plusieurs décennies. Un arbre planté aujourd'hui sera adulte dans 40-60 ans et sera, lui, confronté aux aléas prédits par les modèles des changements climatiques. Si la mortalité forestière excède les prédictions actuelles, ce sont des écosystèmes entiers qui seront en danger. Si ces décisions prises ne sont pas adéquates, l'impact sur toute l'industrie forestière sera dramatique mais plus encore qu'un impact économique, ce sont les conséquences écologiques qu'il faut prendre en compte (pour plus d'informations, voir la fiche 5.4 du rapport coordonné par Sandra Lavorel « Les mécanismes d'adaptation de la biodiversité aux changements climatiques et leurs limites », 2017).

La prise de risque par les gestionnaires des forêts est grande car ils doivent anticiper la demande de bois dans plusieurs décennies face à un climat changeant. Les outils disponibles à la décision des gestionnaires forestiers sont nombreux et étroitement liés avec le domaine de la recherche. Ainsi, les gestionnaires sont invités à privilégier les mélanges d'essences, à adopter une gestion plus dynamique des forêts comme par exemple une diminution de la surface foliaire de l'arbre qui diminuera la perte en eau par transpiration. De grandes incertitudes pèsent donc sur la forêt de demain mais le monde de la recherche propose des plans de gestions pour palier à ces incertitudes. L'étude de la réponse d'arbre de statut majeur de la sylviculture française face à des aléas climatiques extrêmes est donc nécessaire.

C'est pourquoi l'élaboration d'expérimentations comme celles faites au sein de ce travail de thèse permettent d'obtenir des connaissances sur les processus amenant à un phénomène de

mortalité et peuvent orienter la décision des gestionnaires forestiers. Nos approches se distinguent en plusieurs points. Notre approche faite sur un temps plus long et sur des individus plus âgés qu'un stade semis, est assez peu commune. Nous avons pu constater dans notre étude que le hêtre présente une résistance face à un événement extrême telle une sécheresse édaphique sur une longue durée, plus de 30 mois. Néanmoins, cette résistance s'est faite au détriment d'une augmentation de la biomasse. Le hêtre est connu pour adapter rapidement sa croissance radiale et présenter peu de mortalité et notre étude permet de mettre en avant cette résistance. On peut cependant se questionner sur le rôle de puits de carbone pour des forêts de hêtres dans des décennies et lors de confrontations à des aléas plus importants qu'aujourd'hui. En effet, en remobilisant ses réserves carbonées là où les nouveaux squelettes carbonés issus de la photosynthèse ne suffiraient plus, le hêtre pourrait diminuer sa contribution dans la mitigation de l'augmentation du CO₂ en devenant de moins en moins un puits de carbone. Au vu des résultats des études présentées dans ce manuscrit, il est donc nécessaire de choisir de manière judicieuse les stations dans lesquelles planter de nouvelles hêtraies et les maintenir dans des stations fertiles. Néanmoins, il est nécessaire aussi de poursuivre le travail d'investigation sur ces phénomènes de mortalité. Les limites de nos études étant réelles également. Nous avons étudié l'impact d'une sécheresse ou d'une défoliation mais pas la combinaison sécheresse et défoliation qui pourrait constituer un stress plus important pour les arbres. En effet, des zones de dépérissement de hêtres comme la forêt de Fontainebleau en 2003 (Delaporte, 2015) présentent souvent des mortalités de branches ou des descentes de cimes induisant des houppiers clairsemés. La prévention de toutes attaques biotiques a également été faite au cours de notre étude induisant forcément un biais par rapport à une situation naturelle. Une autre limite de notre étude est le stade de nos arbres, c'est-à-dire 8 ans en 2014. Il est nécessaire d'étudier la réponse d'arbres matures à des contraintes abiotiques fortes bien que cela relève d'un challenge bien plus important à mettre en place. Les futures forêts qui seront sujettes aux changements climatiques ne seront pas équiennes et des arbres de différents stades d'âge seront confrontés à des limitations des ressources. Aussi, pour mieux appréhender le futur de nos forêts, il est nécessaire de continuer les recherches en multipliant les approches expérimentales.

CHAPITRE 10: ANNEXES

ANNEXE N°1

**PROTOCOLES DES DIFFERENTES METHODES
D'EXTRACTION TESTEES POUR LE DOSAGE DES NSC ISSUS
DE LA DYNAMIQUE RAMEALE**

Méthode n°1 : Extraction au mélange ternaire (MeOH, CH₃OH, H₂O) des sucres solubles

1) Séchage de la poudre :

Sécher les poudres lyophilisées en étuve à 40-50°C (une matinée ou une nuit).

2) Pesée :

Peser 10 mg(*) de matière sèche lyophilisée dans un tube T1.

(*) : On peut peser de 3 et 6 mg si vraiment peu de matière.

3) Extraction 1 :

Passage des composés polaires et apolaires en solution et séparation par rapport aux débris cellulaires.

- Extraire avec 0,8 ml de **méthanol/chloroforme/eau** (12/5/3, v/v/v).

- Attendre 30 min à 20 °C.

- Centrifuger 10 min à 5°C et 2000 g.

- Récupérer le surnageant dans un tube T2.

- Renouveler l'opération 1 x afin d'épuiser l'échantillon, en joignant le 2ème surnageant au premier.

- Sur le culot résiduel, mettre 1 ml de **méthanol à 60 %** (v/v) et placer au frigo en attente de l'extraction de l'amidon.

4) Extraction 2 :

Extraction des métabolites polaires (acides organiques, acides aminés solubles, protéines, sucres solubles ...) contenus dans le mélange des 2 surnageants précédents.

- Ajouter aux surnageants (env. 2,4 ml) :

2 ml de **méthanol/chloroforme** (v/v).

0,8 ml d'**eau** distillée.

- Agiter au vortex.

- Centrifuger 5 min à 2000g

- Récupérer la fraction légère incolore (aqueuse) dans un tube T3.

(Attention ! Ne prélever que la phase supérieure).

- Sur la fraction lourde, ajouter 1 ml de **méthanol à 60 %**.

- Agiter au vortex.

- Centrifuger 5 min à 2000g.

- Récupérer la fraction légère et la joindre à la première.

5) Evaporation :

Conseil : Placer 30 minutes les tubes T3 au congélateur avant de les mettre dans l'évaporateur sous vide pour éviter les rejets lors du pompage.

Pendant ce temps mettre en route l'évaporateur sous vide.

Evaporer à sec dans un évaporateur sous vide (une nuit).

6) Matériel nécessaire :

- Blouse de labo
- Travail sous hotte ou sorbonne
- Gants jetables imperméables aux solvants
- Spatule de pesée
- Minuteur
- Tubes type eppendorf 2ml à vis
- Tubes polypropylène 5 ml (ou tubes hémolyse en verre renforcé de 6 ml)
- Vortex
- Pipettes 1ml (et embout pipette) et 5 ml
- Ultra-centrifugeuse réfrigérée
- Balance de précision
- Congélateur -20°C
- Evaporateur sous vide
- Glace pilée
- Eau distillée ou ultrapure
- Méthanol
- Chloroforme

Remarques importantes:

* Tubes :

Matières résistant au CHCl_3 et CH_3OH : verre, polypropylène, polyéthylène (LPDE, HPDE), ou téflon (PFA, PTFE).

Diamètre 13 mm, 6 ml minimum, bouchons (silicone...).

* Dès que les sucres se trouvent en milieu aqueux (extraction 2), il faut aller vite et éventuellement stocker au froid (-20°C) car ils peuvent subir des transformations ou stocker les tubes à -20°C en attente du dosage.

Méthode n°2 : Extraction au méthanol 70% à froid des sucres solubles

1) Séchage de la poudre :

Sécher les poudres lyophilisées en étuve à 40-50°C (une matinée ou une nuit).

2) Pesée :

Peser entre 5 et 10 mg de poudre lyophilisée dans un tube **T1** (eppendorf 2ml à vis).

La fiabilité des dosages dépend intégralement de la finesse de la poudre. Précision de la pesée au 10^{ème} de mg (donc peser sur une balance suffisamment précise).

3) Extraction :

- Ajouter 650 µl de méthanol à 70% (méthanol/eau, 7/3, v/v).
- Vortexer.

- Laisser incuber pendant 10 min à température ambiante.
- Centrifuger à 17 000 g pendant 5 min.
- Transférer le surnageant à la pipette dans un tube (T2) de 5mL en polypropylène.
- Répéter l'extraction 2 fois.
- Rassembler les 3 surnageants dans le tube T2.
- Sécher les surnageants dans un évaporateur à rotation sous vide d'air pendant 12 heures.
- Placer le tube T1 contenant le culot insoluble au congélateur à -20°C en attente de l'extraction d'amidon.

4) Evaporation :

Conseil : Placer 30 minutes les tubes T2 au congélateur avant de les mettre dans l'évaporateur sous vide pour éviter les rejets lors du pompage.

Evaporer les tubes T2 à sec dans un évaporateur sous vide (une nuit).

Stocker les tubes T1 et T2 bouchés au congélateur à -20°C en attente de l'extraction de l'amidon et du dosage des sucres.

5) Matériel nécessaire :

- -Blouse de labo
- Travail sous hotte ou sorbonne
- Gants jetables imperméables aux solvants
- Spatule de pesée
- Minuteur
- Tubes type eppendorf 2ml à vis
- Tubes de 5 ml polypropylène ou (tube hémolyse en verre 6ml)
- Vortex
- Pipette 1ml (et embout pipette)
- Ultra-centrifugeuse réfrigérée
- Balance de précision
- Congélateur -20°C
- Evaporateur sous vide (avec piège à froid à -100°C)
- Eau distillée ou ultrapure
- Méthanol

Méthode n°3 : Extraction à l'éthanol à 80% à chaud des sucres solubles

Séchage de la poudre :

Sécher les poudres lyophilisées en étuve à 40-50°C (une matinée ou une nuit).

1) Pesée :

Peser entre 5 et 10 mg de poudre lyophilisée dans un tube **T1** (eppendorf 2ml à vis).

La fiabilité des dosages dépend intégralement de la finesse de la poudre. Précision de la pesée au 10^{ème} de mg (donc peser sur une balance suffisamment précise).

2) Extraction :

Cette méthode permet d'extraire tous les composés solubles dans l'éthanol et l'eau : les métabolites polaires (acides organiques, acides aminés, sucres...) et des composés apolaires (pigments hydrosolubles ...).

NB : Les sucres peuvent subir des transformations en milieu aqueux (présence d'enzymes), il faut donc les mettre dans un bac de glace pendant les manipulations et les stocker au froid à -20°C

- Ajouter 1 ml d'éthanol à 80%.
- Vortexer.
- Incuber au bain marie à 80°C pendant 30 mn.
- Centrifuger 10 mn à 10000 g.
- Récupérer grossièrement le surnageant à la pipette dans un tube **T2** (polypropylène, 5 ml ou tube à hémolyse verre 6 ml), maintenir dans la glace.
- Renouveler l'extraction d'extraction 2 fois.
- Evaporation des tubes **T2** (contenant les 3 surnageants soit env. 3 ml) à sec et à froid dans un évaporateur sous vide pendant 5h environ.

3) Evaporation :

Conseil : Placer 30 minutes les tubes T2 au congélateur avant de les mettre dans l'évaporateur sous vide pour éviter les rejets lors du pompage.

Evaporer les tubes T2 à sec dans un évaporateur sous vide (une nuit).

Stocker les tubes T1 et T2 bouchés au congélateur à -20°C en attente de l'extraction de l'amidon et du dosage des sucres.

4) Matériel nécessaire :

- -Blouse de labo
- Gants jetables imperméables aux solvants
- Tubes type eppendorf 2ml à vis
- Spatule de pesée
- Minuteur
- Tubes polypropylène 5ml (ou tubes hémolyse en verre 6 ml)
- Bain marie
- Vortex
- Pipette 1ml (et embout pipette)
- Ultra-centrifugeuse réfrigérée
- Balance de précision
- Congélateur -20°C
- Evaporateur sous vide
- Glace pilée
- Eau distillée ou ultrapure
- Ethanol

ANNEXE N°2

PROTOCOLES DU DOSAGE DE L'AMIDON POUR LE DOSAGE
DES NSC ISSUS DE LA DYNAMIQUE RAMEALE

Extraction et dosage enzymatique de l'amidon

1) Solubilisation

- Centrifuger les tubes épuisés en sucres solubles, et contenant le culot insoluble 2000G 10 mn.
- Assécher le culot sous vide 15 mn pour éliminer l'alcool.
- Faire une pesée P1 (tube + culot).
- Ajouter 0,9 ml de soude 0,02 N et mélanger au vortex.
- Faire bouillir ½ heure tubes bouchés.
- Refroidir les tubes.

2) Hydrolyse enzymatique

- Ajouter 0,1 ml d'amyloglucosidase (le pH remonte vers 4,6).
- Laisser au bain marie ½ heure à 50°C (tubes bouchés).
- Faire une pesée P2 (tube +culot +extrait glucose).
- P2 - P1 = volume de l'échantillon (volume = poids car densité voisine de 1 : on a de l'eau + 1 peu de glucose).

3) Dosage :

NB : A effectuer dans la foulée et au froid dans la glace.

- Centrifuger 10 min à 2000g et 5°C.
- Garder les tubes au froid (glace pilée pendant le dosage).
- Pipetages en µl (microcuve PMMA UV/VIS de 1,6 ml, spectrophotomètre à bande passante < 2 nm).

Volume final : 0,9 ml par micro-cuve.

Mesures de DO à 340 nm.

	Témoin	Extrait
Triéthanolamine	250	250
H₂O	540	490
NADP	50	50
ATP	50	50
Echantillon		50
	Homogénéiser. Lire DO1. Attendre 10 min.	Homogénéiser. Lire DO1. Attendre 10 min.
HK/G6PDH	10	10
	Homogénéiser. Attendre 15 min. Lire DO2.	Homogénéiser. Attendre 15 min. Lire DO2.

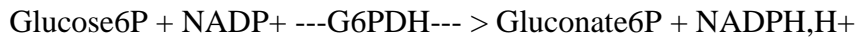
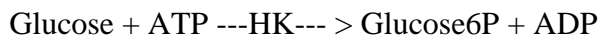
Volume total 0,9 ml.

Solutions standard : Glucose, 1 H₂O 1,1%. Pour 50 µl DO = 0,39

Calcul de la concentration en g/l : 0,515 x (DO₂ – DO₁) pour 50 µl d'échantillon.

Principe :

Mesure indirecte de la quantité de glucose, basée sur la relation stœchiométrique entre la quantité de glucose de l'extrait et le NADPH formé lors de la réaction enzymatique :



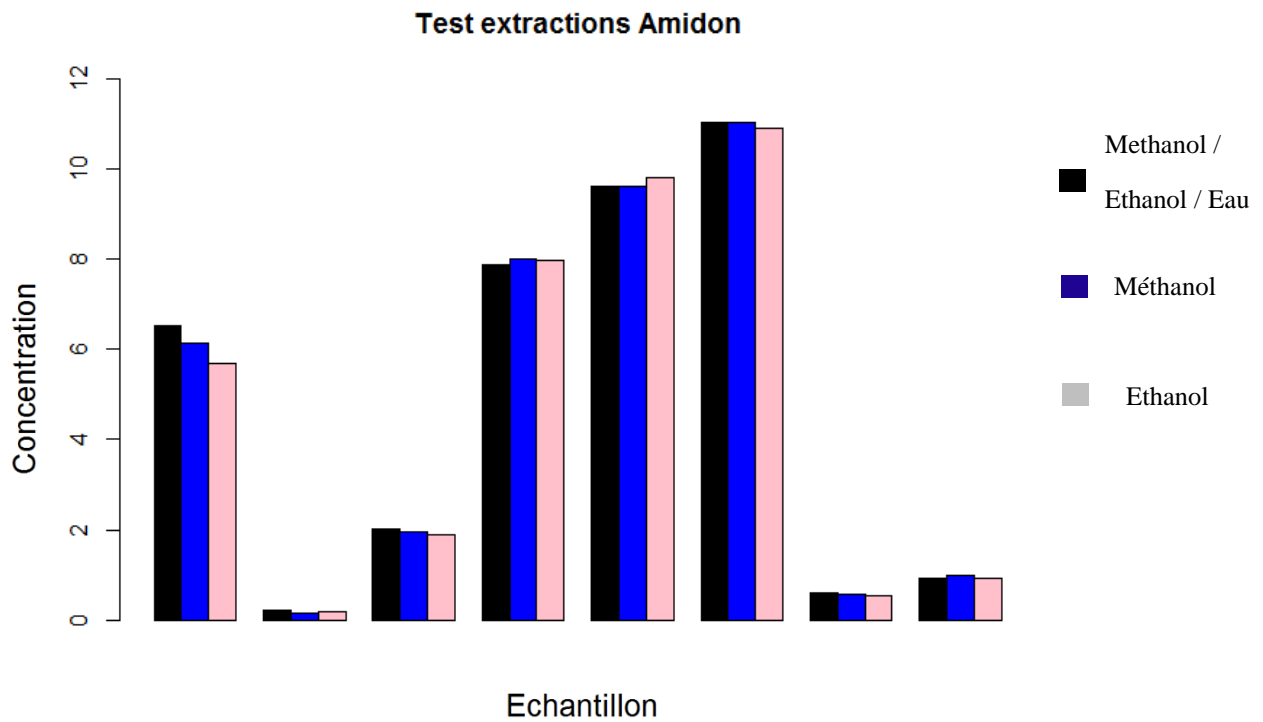
Remarque :

PM (Glucose ou Fructose) = 180,16 g/mole (C₆H₁₂O₆)

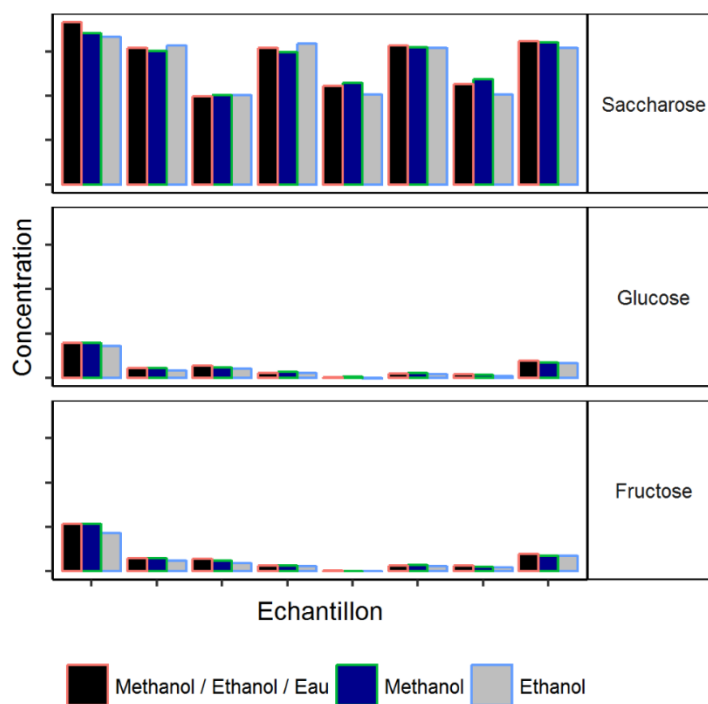
ANNEXE N°3

RESULTATS OBTENUS POUR LE TEST DES TROIS
METHODES D'EXTRACTION

I. Comparaison des méthodes d'extractions sur les concentrations d'amidon via la méthode de dosage présentée en annexe (g.100g⁻¹ MS)



II. Comparaison des méthodes d'extractions sur les concentrations en sucres solubles via HPLC (g.100g⁻¹ MS)



LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- Adams H.D., Guardiola-Claramonte M., Barron-Gafford G.A., Villegas J.C., Breshears D.D., Zou C.B., Troch P.A., Huxman T.E.** 2009. Temperature sensitivity of drought-induced tree mortality portends increased regional die-off under global-change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**: 7063–7066.
- Adams T.S., McCormack M.L., Eissenstat D.M.** 2012 Foraging strategies in trees of different root morphology: the role of root lifespan. *Tree Physiology* **33**:940–948.
- Agrawal A.A.** 2005. Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**: 97–105.
- Aguadé D., Poyatos R., Gómez M., Oliva J., Martínez-Vilalta J.** 2015. The role of defoliation and root rot pathogen infection in driving the mode of drought-related physiological decline in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Physiology* **35**: 229–242.
- Allen C.D., Macalady A.K., Chenchouni H., et al.** 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660–684.
- Allen C.D., Breshears D.D., McDowell N.G.** 2015. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* **6**: 129.
- Améglio, T., Cochard, H., Lacoïnte, A., Ewers, F.W., Sauter, J., Martignac, M., Vandame, M., Bodet, C., Cruiziat, P.** 2001. Adaptation to cold temperature and response to freezing in walnut tree. *Acta Horticulturae*, **544**: 247-254.
- Améglio, T., Bodet, C., Lacoïnte, A., Cochard, H.** 2002. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology* **22**: 1211-1220.
- Améglio, T., Decourteix, M., Alves, G., Valentin, V., Sakr, S., Julien, J.L., Pétel, G., Guilliot, A., Lacoïnte, A.** 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees : evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology* **24**: 785-793.
- Améglio, T., Cruiziat, P.** 1992. Alternance tension/pression de la sève dans le xylème chez le noyer pendant l'hiver. Rôle des températures. *Compte Rendu Académique Scientifiques. Paris, Série III : Sciences et Vie* **315** : 429-435.
- Anderegg, W.R.L., Kane, J.M., Anderegg, L.D.L.** 2013. Consequences of widespread tree mortality triggered by drought and temperature stress. *Nature Climate Change* **3**: 30–36.
- Anderegg W.R.L., Berry J.A., Field C.B.** 2012. Linking definitions, mechanisms, and modeling of drought-induced tree death. *Trends in Plant Science* **17**: 693–700.
- Anderegg W.R.L., Hicke J., Fisher R, et al.** 2015. Tree mortality from drought, insects, and their interactions in a changing climate. *New Phytologist* **208**: 674-683.
- Anderegg W.R.L., Anderegg L.D.L.** 2013 Hydraulic and carbohydrate changes in experimental drought-induced mortality of saplings in two conifer species. *Tree Physiology* **33**: 252–260.
- Anderson L.J., Comas L.H., Lakso A.N., Eissenstat D.M.,** 2003 Multiple risk factors in root survivorship: a 4-year study in Concord grape. *New Phytologist* **158**: 489–501.

- Aranda, I., L. Castro, M. Pardos, L. Gil, J.A. Pardos.** 2005. Effects of the interaction between drought and shade on water relations, gas exchange and morphological traits in cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. *Forest Ecology and Management*. **210**: 117–129.
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avice J.C., Nogués S.** 2011 Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **62**:111–123.
- Araya, T., Kubo, T., von Wiren, N., Takahashi, H.** 2015 Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*. **58**: 254–265.
- Ashton I.W., Miller A.E., Bowman W.D., Suding K.N.** 2008 Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. *Oecologia*, **156**: 625-636.
- Atkin O.K., Macherel D.** 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* **103**: 581–597.
- Baber O., Slot M., Celis G., Kitajima K.** 2014 Diel patterns of leaf carbohydrate concentrations differ between seedlings and mature trees of two sympatric oak species. *Botany* **92**: 535–540.
- Backes K., Leuschner C.** 2000. Leaf water relations of competitive *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea* trees during 4 years differing in soil drought. *Canadian Journal of Forest Research* **30**: 335–346.
- Badeau V., Dupouey J.L., Cluzeau C., Drapier J., Le Bas C.,** 2004. Modélisation et cartographie de l'aire climatique potentielle des grandes essences forestières françaises. In : Rapport final, CARBOFOR. Séquestration de carbone dans les grands écosystèmes forestiers en France : quantification, spatialisation, vulnérabilité et impacts de différents scénarios climatiques et sylvicoles. Volet D1. *Programme GICC*, INRA Bordeaux, 101-111.
- Badeau V., Dupouey J.L., Cluzeau C., Drapier J., Le Bas C.** 2010 Climate change and the biogeography of French tree species: first results and perspectives. *Loustaun D (ed) Forests, carbon cycle and climate change, Ed Quae, Paris*, pp 231-252.
- Barbaroux C., Bréda N., Dufrêne E.** 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* **157**: 605–615.
- Barbaroux C., Bréda N.** 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. *Tree physiology* **22**: 1201–1210.
- Barigah T.S., Charrier O., Douris M., Bonhomme M., Herbette S., Améglio T., Fichot R., Brignolas F., Cochard H.** 2013 Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany* **112**:1431–1437.
- Bastien Y.** 2000. Sylviculture du hêtre. Engref: 19.
- Bazot S., Barthes L., Blanot D., Fresneau C.** 2013. Distribution of non-structural nitrogen and carbohydrate compounds in mature oak trees in a temperate forest at four key phenological stages. *Trees - Structure and Function* **27**: 1023–1034.
- Bazot, S., Fresneau, C., Damesin, C., Barthes, L.,** 2016. Contribution of previous year's leaf N and soil N uptake to current year's leaf growth in sessile oak. *Biogeosciences* **13**: 3475–3484.

- Bernier P., Schöne D.** 2009 Adapting forests and their management to climate change: an overview. *Unasylva* **60**: 5–11.
- Bigler C., Braker O.U., Bugmann H., Dobbertin M., Rigling A.** 2006 Drought as an inciting mortality factor in Scots pine stands of the Valais, Switzerland. *Ecosystems*, **9**: 330–343.
- Bigler C., Veblen T.T.** 2009. Increased early growth rates decrease longevities of conifers in subalpine forests. *Oikos* **118**: 1130–1138.
- Binnie, S.C., Grossnickle S.C., Roberts D.R.** 1994. Fall acclimation patterns of interior spruce seedlings and their relationship to changes in vegetative storage proteins. *Tree Physiology* **14**: 1107–1120.
- Bloemen, J., Vergeynst, L., Overlaet-Michiels, L., Steppe K.** 2016 How important is woody tissue photosynthesis in poplar during drought stress? *Trees - Structure and Function*, **30**: 63–72.
- Bode, J., Kuhn H.P., Wild A.** 1985. Die Akkumulation von Prolin in Nadeln geschldigter Fichten (*Picea abies* [L.] Karst). *Forstw. Cbl.* **104**: 353–60.
- Boehringer, S.A.** 1984. Methods of enzymatic food analysis using single reagents. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany, 79 p.
- Borchert R.** 1994 Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology* **75**: 1437–1449.
- Bossel H.** 1986 Dynamics of forest dieback: Systems analysis and simulation. *Ecology Modelling* **34**: 259–288.
- Bouche P.S., Larter M., Domec J.C., Burlett R., Gasson P., Jansen S., Delzon S.** 2014. A broad survey of hydraulic and mechanical safety in the xylem of conifers. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4419–4431.
- Boyer J.S.** 1970 Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology* **46**: 233–235.
- Brant, A. N., Chen, H. Y. H.** 2015 Patterns and mechanisms of nutrient resorption in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **34**: 471–486.
- Bréda, N., Granier, A., Aussenac, G.** 1995 Effects of thinning on soil and tree water relations, transpiration and growth in an oak forest (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), *Tree Physiology* **15**: 295–306.
- Bréda N., Huc R., Granier A. and Drewer E.** 2006. Temperate forest tree and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annales des Sciences Forestières* **63**: 625–644.
- Bréda N., Peiffer M.** 2014. Vulnerability to forest decline in a context of climate changes: new prospects about an old question in forest ecology. *Annals of Forest Science* **71**: 627–631.
- Breshears, D.D., Myers, O.B., Meyer, C.W., Barnes, F.J., Zou, C.B., Allen, C.D., McDowell, N.G., Pockman, W.T.** 2009 Research communications research communications Tree die-off in response to global change- type drought: mortality insights from a decade of plant water potential measurements. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **7**: 185–189.

- Brodersen C.R., McElrone A.J., Choat B., Matthews M.A., Shackel K.A.** 2010 The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiology* **154**: 1088–1095.
- Brodribb T.J., Bowman D.J.M.S., Nichols S, Delzon S, Burlett R.** 2010. Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist* **188**: 533–542.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D.** 2003. The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 3–22.
- Bussotti F., Pollastrini M., Gessler A., Luo Z-B.** 2018. Experiments with trees: From seedlings to ecosystems. *Environmental and Experimental Botany*. **152**: 1-6.
- Cai Y.F., Barber P.A., Dell B., et al.** 2010 Soil bacterial functional diversity is associated with the decline of Eucalyptus gomphocephala. *Forest Ecology and Management* **260**: 1047–1057.
- Cailleret M., Nourtier M., Amm A., Durand-Gillmann M., Davi H.** 2014. Drought-induced decline and mortality of silver fir differ among three sites in Southern France. *Annals of Forest Science* **71**: 643–657.
- Cailleret M., Jansen S., Robert E.M.R. et al.** 2017. A synthesis of radial growth patterns preceding tree mortality. *Global Change Biology* **23**: 1675–1690.
- Canadell J., López-Soria L.** 1998. Lignotuber reserves support regrowth following clipping of two Mediterranean shrubs. *Functional Ecology* **12**: 31–38.
- Cañas R., de la Torre F., Pascual M., Avila C., Cánovas F.** 2016. Nitrogen Economy and Nitrogen Environmental Interactions in Conifers. *Agronomy* **6**: 26-32.
- Canham C.D., Kobe R.K., Latty E.F., Chazdon R.L.** 1999. Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: Effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia* **121**: 1–11.
- Cánovas, F.M., Avila, C., Cantón, F.R., Cañas, R.A., de la Torre, F.** 2007. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 2307–2318.
- Cantón, F.R., Suárez, M.F., Cánovas, F.M.** 2005 Molecular aspects of nitrogen mobilisation and recycling in trees. *Photosynthesis Research*, **83**: 265–278.
- Carbone M.S., Czimczik C.I., McDuffee K.E., Trumbore S.E.** 2007. Allocation and residence time of photosynthetic products in a boreal forest using a low-level ¹⁴C pulse-chase labeling technique. *Global Change Biology* **13**: 466–477.
- Cavender-Bares J., Bazzaz F.A.** 2000. Changes in drought response strategies with ontogeny in *Quercus rubra*: implications for scaling from seedlings to mature trees. *Oecologia* **124**: 8–18
- Chapin, F.S., Schulze E.D., Mooney H.A.** 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 423–447.
- Charru M., Seynave I., Morneau F., Bontemps J-D.** 2010. Recent changes in forest productivity: an analysis of national forest inventory data for common beech (*Fagus sylvatica* L.) in north-eastern France. *Forest Ecology and Management* **260**: 864–874.

- Chebib A., Badeau V., Boe J., et al.** 2012. Climate change impacts on tree ranges: Model intercomparison facilitates understanding and quantification of uncertainty. *Ecology Letters* **15**: 533–544.
- Cheng L., Fuchigami L.H.** 2002. Growth of young apple trees in relation to reserve nitrogen and carbohydrates. *Tree physiology* **22**: 1297–1303.
- Cheng L., Dong S., Fuchigami L.H.** 2002. Urea uptake and nitrogen mobilization by apple leaves in relation to tree nitrogen status in autumn. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **77**: 13–18.
- Cherbuy B., Joffre R., Gillon D., Rambal S.** 2001 Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiology* **21**: 9–17.
- Choat B., Brodrick T.J., Brodersen C.R., Duursma R.A., López R., Medlyn B.E.** 2018. Triggers of tree mortality under drought. *Nature* **558**: 531–539.
- Churkina, G., Schimel D. S., Braswell B. H., Xiao X.,** 2005: Spatial analysis of growing season length control over net ecosystem exchange. *Global Change Biology*, **11**: 1777-1787.
- Ciais P., Schelhaas M.J., Zaehle S., et al.** 2008. Carbon accumulation in European forests. *Nature Geoscience*, **1**: 425-429.
- Clark D., Clark D., Oberbauer S.** 2010 Annual wood production in a tropical rain forest in NE Costa Rica linked to climatic variation but not to increasing CO₂. *Glob Chang Biol* **16**: 747–759.
- Cleveland, C. C., Houlton, B. Z., Smith, W. K., Marklein, A. R., Reed, S. C., Parton, W., Running, S. W.** 2013. Patterns of new versus recycled primary production in the terrestrial biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **110**: 12733–12737.
- Cochard, H., Lemoine, D., Dreyer, E.,** 1999. The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Environment*. **22**: 101–108
- Cochard H., Barigah S.T., Kleinhentz M., Eshel A.** 2008 Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *Journal of Plant Physiology* **165**: 976–982.
- Cochard H., Delzon S.** 2013. Hydraulic failure and repair are not routine in trees. *Annals of Forest Science* **70**: 659–661.
- Coleman M., Dickson R., Isebrands J.** 2000 Contrasting fine-root production, survival and soil CO₂ efflux in pine and poplar plantations. *Plant Soil* **225**: 129–139.
- Cooke J.E.K., Weih M.** 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: Bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* **167**: 19–30.
- Cools N., Vesterdal L., De Vos B., Vanguelova E., Hansen K.** 2014. Tree species is the major factor explaining C: N ratios in European forest soils. *Forest Ecology and Management* **311**: 3–16.
- Corlett R.** 2011 Impacts of warming on tropical lowland rainforests. *Trend in Ecology and Evolution* **26**:606–613.

- Coumou D., Robinson A., Rahmstorf S.** 2013 Global increase in record- breaking monthly-mean temperatures. *Climatic Change* **118**: 771–782.
- Cowan I.** 1982 Regulation of water use in relation to carbon gain in higher plants. In: Lange OE, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Encyclopedia of plant physiology*. Springer, Berlin, pp 489–613.
- Crawford N.M., Forde B.G.,** 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *Arabidopsis Book* **1**: e0011.
- Cregger M.A., McDowell N.G., Pangle R.E., Pockman W.T., Classen A.T.** 2014. The impact of precipitation change on nitrogen cycling in a semi-arid ecosystem. *Functional Ecology* **28**: 1534–1544
- Cruziat P., Cochard H., Améglio T.** 2002 Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science* **59**: 723–752.
- Cufar, K., Prislan P. and Gricar J.** 2008. Cambial activity and wood formation in beech (*Fagus sylvatica* L.) during the 2006 growth season. *Wood Research* **53**: 1–12.
- D’Orangeville L., Maxwell J., Kneeshaw D., et al.** 2018. Drought timing and local climate determine the sensitivity of eastern temperate forests to drought. *Global Change Biology* **24**: 2339 – 2351.
- Da Silva, E** 2010. Ecologie du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) en marge sud-ouest de son aire de distribution. Lorraine University.
- Dai Y., Wang L., Wan X.** 2018. Relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality caused by drought. *AoB PLANTS* **10**: 1–17.
- Damesin, C., Lelarge, C.,** 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from. *Plant, Cell & Environment*, **26**: 207–219.
- Dannenmann M., Bimüller C., Gschwendtner S., et al.** 2016. Climate Change Impairs Nitrogen Cycling in European Beech Forests. *Plos One* **11**: e0158823.
- Dannoura M., Maillard P., Fresneau C.** 2011 In situ assessment of the velocity of carbon transfer by tracing ¹³C in trunk CO₂ efflux after pulse labelling: variations among tree species and seasons. *New Phytologist* **190**: 181–192.
- Dannoura M., Epron D., Desalme D., et al.** 2018. The impact of prolonged drought on phloem anatomy and phloem transport in young beech trees. *Tree Physiology*: 1–10.
- Davidson C.B., Gottschalk K.W., Johnson J.E.** 1999 Tree mortality following defoliation by the European gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in the United States: a review. *Forest Science* **45**: 74–84.
- Delaporte A.** Vers une compréhension fonctionnelle des dépérissements forestiers : étude du cas du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) en forêt de Fontainebleau. Ecologie, Environnement. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français.
- Delaporte A., Bazot S., Damesin C.** 2016. Reduced stem growth, but no reserve depletion or hydraulic impairment in beech suffering from long-term decline. *Trees* **30**: 265–279.
- Delzon S., Cochard H.** 2014 Recent advances in tree hydraulics high- light the ecological significance of the hydraulic safety margin. *New Phytologist* **203**: 355–358.

- Desalme D., Priault P., Gérant D., et al.** 2016. Seasonal variations drive short-term dynamics and partitioning of recently assimilated carbon in the foliage of adult beech and pine. *New Phytologist*. **302**: 355-362.
- Deslauriers A., Rossi S., Anfodillo T.** 2007 Dendrometer and intra- annual tree growth: what kind of information can be inferred? *Dendrochronologia* **25**: 113–24.
- Deslauriers, A., Beaulieu, M., Balducci, L., Giovannelli, A., Gagnon, M. J., Rossi, S.** 2014. Impact of warming and drought on carbon balance related to wood formation in black spruce. *Annals of Botany*, **114**: 335–345.
- Dezi S., Medlyn B.E., Tonon G., Magnani F.** 2010 The effect of nitrogen deposition on forest carbon sequestration: a model-based analysis. *Global Change Biology*, **16**: 1470–1486.
- Dickman L.T., McDowell N.G., Sevanto S. et al.** 2015 Carbohydrate dynamics and mortality in a pinon-juniper woodland under three future precipitation scenarios. *Plant Cell and Environment*, **38**: 729–739.
- Dickson R.E.** 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. *Transport* **46**: 631–647.
- Dietze M.C., Sala A., Carbone M.S., et al.** 2014. Nonstructural Carbon in Woody Plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 667–687.
- Dilley D.R., Walker D.R., Horticulture O.F., Carolina N., College S.** 1961. Assimilation of C14, N15 labeled urea by excised apple and peach leaves. *Plant physiology* **1250**: 757–761.
- Ditmarova S., Kurjak D., Palmroth S., Kmet J., Strelcova K.** 2010 Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiology* **30**: 205–213.
- Dittmar C., Zech W., Elling W.** 2003 Growth variations of Common beech (*Fagus sylvatica* L.) under different climatic and environmental conditions in Europe - a dendroecological study. *Forest Ecology and Management* **173**: 63–78.
- Dong S., Cheng L., Scagel C.F., Fuchigami L.H.** 2002. Nitrogen absorption, translocation and distribution from urea applied in autumn to leaves of young potted apple (*Malus domestica*) trees. *Tree physiology* **22**: 1305–1310.
- Duan H., Amthor J.S., Duursma R., O’Grady A.P., Choat B., Tissue D.T.** 2013. Carbon dynamics of eucalypt seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO₂] and elevated temperature. *Tree Physiology* **33**: 779–792.
- Dulamsuren, C., Hauck, M., Kopp, G., Ruff, M., & Leuschner, C.** 2016 European beech responds to climate change with growth decline at lower, and growth increase at higher elevations in the center of its distribution range (SW Germany). *Trees*, **31** : 673–686.
- Dupouey J.L.,** 1992. Déplacement des aires de répartition des essences forestières et évolution de la composition des peuplements. In : Landmann G. (ed.), Les recherches en France sur les éco- systèmes forestiers : actualités et perspectives. Paris : Ministère de l’agriculture et de la pêche (DERF), pp. 57-58.
- Eichhorn J., Icke R., Isenberg A., Paar U., Schönfelder E.** 2005 Temporal development of crown condition of beech and oak as a response variable for integrated evaluations. *The European Journal of Development Research* **124**: 335–347.
- El Zein R.,** 2011. Thesis. Dynamiques saisonnières des réserves carbonées et azotées chez le chêne sessile (*Quercus petraea*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*) adultes. Lorraine University.

- El Zein R., Maillard P., Bréda N., Marchand J., Montpied P., Gérant D.** 2011a. Seasonal changes of C and N non-structural compounds in the stem sapwood of adult sessile oak and beech trees. *Tree Physiology* **31**: 843–854.
- El Zein R., Bréda N., Gérant D., Zeller B., Maillard P.** 2011b. Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: An in situ ¹⁵N labeling approach. *Tree Physiology* **31**: 1390–1400.
- Ellenberg H., Leuschner C.** 2010 *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht*, 6th edn. Ulmer, Stuttgart.
- Elling W., Heber U., Polle A., Beese F.** 2007 *Schädigung von Waldökosystemen*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Ellsworth, D.S., Reich, P.B.,** 1995. Canopy structure and vertical patterns of photosynthesis and related leaf traits in a deciduous forest. *Oecologia* **96**: 169–178.
- Epron D.J., Bahn M., Delphone D., Lattanzi F.A., Pumpanen J., Gessler A., Buchmann N.** 2012 Pulse-labeling trees to study carbon allocation dynamics: a review of current knowledge and future prospects. *Tree Physiology* **32**: 776–798.
- Evans JR, Seemann JR** 1989 The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. *Briggs W*: 183- 205.
- Ewers, F.W., Améglio, T., Cochard, H., Beaujard, F., Martignac, M., Vandame, M., Bodet, C., Cruiziat, P.** 2001. Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree Physiology* **21**: 1123–1132.
- Eyles, A., E. A. Pinkard, C. Mohammed.** 2009. Shifts in biomass and resource allocation patterns following defoliation in *Eucalyptus globulus* growing with varying water and nutrient supplies. *Tree Physiology* **29**: 753–764.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D.,** 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology* **33** : 317–345.
- Fatichi S., Leuzinger S., Korner C.** 2014 Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink-driven vegetation modeling. *New Phytologist* **201**: 1086–1095.
- Field, C.B., H.A. Mooney.** 1986. The photosynthesis--nitrogen relationship in wild plants. In *On the Economy of Plant Form and Function*. Ed. T.J. Givnish. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 25-55.
- Finzi A.C., Norby R.J., Calfapietra C., et al.** 2007. Increases in nitrogen uptake rather than nitrogen-use efficiency support higher rates of temperate forest productivity under elevated CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 140-149.
- Fischlin A., Ayres M., Karnosky D., et al.** 2009 Future environmental impacts and vulnerabilities. In: Seppälä R, Buck A, Katila P (eds) *Adaptation of forests and people to climate change: a global assessment report*, vol 22. IUFRO World Series, Helsinki, pp 53– 100.
- Flexas J., Bota J., Galmes J., Medrano H., Ribas-Carbo M.** 2006 Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* **127**: 343–352.
- Fotelli, M.N., Gessler, A., Peuke, A.D., Rennenberg, H.,** 2001. Drought affects the competitive interactions between *Fagus sylvatica* seedlings and an early successional species,

Rubus fruticosus: responses of growth, water status and $\delta^{13}\text{C}$ composition. *New Phytologist* **151**: 427–435.

Fotelli M.N., Rennenberg H., Gessler A. 2002. Effects of Drought on the Competitive Interference of an Early Successional Species (*Rubus fruticosus*) on *Fagus sylvatica* L. Seedlings: ^{15}N Uptake and Partitioning, Responses of Amino Acids and other N Compounds. *Plant Biology* **4**: 311–320.

Fotelli M.N., Rienks M., Rennenberg H., Gessler A. 2004 Climate and forest management affect ^{15}N -uptake, N balance and biomass of European beech seedlings. *Trees - Structure and Function* **18**: 157–166.

Fotelli M.N., Nahm M., Radoglou K. 2009 Seasonal and interannual ecophysiological responses of beech (*Fagus sylvatica*) at its south-eastern distribution limit in Europe. *Forest Ecology and Management* **257**: 1157–1164.

Franklin J.F., Shugart H.H., Harmon M.E. 1987. Tree Death as an Ecological Process. *BioScience* **37**: 550–556.

Frelich, L.E. 2002 The disturbance regime and its components. *Forest Dynamics and Disturbance Regimes* (ed. L.E. Frelich), pp. 15–43. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Gallé, A., Feller, U. 2007 Changes of photosynthetic traits in beech under severe drought stress and during recovery. *Physiologia Plantarum*. **131**: 412–421.

Galvez D.A., Landhäusser S.M., Tyree M.T. 2011 Root carbon reserve dynamics in aspen seedlings: does simulated drought reserve limitation? *Tree Physiology* **31**: 250–257.

Garcia-Forner N., Adams H.D., Sevanto S. 2015. Responses of two semiarid conifer tree species to reduced precipitation and warming reveal new perspectives for stomatal regulation. *Plant, Cell & Environment*; **152**: 412–418.

Gasson, P. 1987. Some implications of anatomical variations in the wood of pedunculate oak (*Quercus robur* L.), including comparison with common beech (*Fagus sylvatica* L.). *IAWA Bull.* **8**: 149–166.

Gaudinski, J.B., M.S. Torn, W.J. Riley, C. Swanston, S.E. Trumbore, J.D. Joslin, H. Majdi, T.E. Dawson, P.J. Hanson. 2009. Use of stored carbon reserves in growth of temperate tree roots and leaf buds: analyses using radiocarbon measurements and modeling. *Global Change Biology*. **15**: 992–1014.

Gaylord M.L., Kolb T.E., Pockman W.T., Plaut J.A., Yopez E.A., Macalady A.K., Pangle R.E., McDowell N.G. 2013. Drought predisposes piñon-juniper woodlands to insect attacks and mortality. *New Phytologist* **198**: 567–578.

Gaylord M.L., Kolb T.E., McDowell N.G. 2015. Mechanisms of pinon pine mortality after severe drought: a retrospective study of mature trees. *Tree Physiology* **35**: 806–816.

Genet H., Bréda N., Dufrêne E. 2009. Age-related variation in carbon allocation at tree and stand scales in beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. *Tree Physiology* **30**: 177–192.

Gérard B., Bréda N. 2012. Radial distribution of carbohydrate reserves in the trunk of declining European beech trees (*Fagus sylvatica* L.). *Annals of Forest Science* **71**: 675–682.

- Gessler A., Schneider S., von Sengbusch D., Weber P., Hanemann U., Huber C., Rothe A., Kreutzer K., Rennenberg H** 1998 Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist* **138**: 275–285.
- Gessler, A., H. Rennenberg, C. Keitel.** 2004. Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech-evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. *Plant Biology* **6**: 721–729.
- Gessler A., Keitel C., Kreuzwieser J., Matyssek R., Seiler W., Rennenberg H.** 2007. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees - Structure and Function* **21**: 1–11.
- Gessler A., Schaub M., McDowell N.G.** 2016. The role of nutrients in drought-induced tree mortality and recovery. *New Phytologist*: **214**: 1443–1447.
- Gibon Y., Pyl E.T., Sulpice R., Lunn J.E., Höhne M., Günther M., Stitt M.** 2009 Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell and Environment* **32**: 859–874.
- Gieger, T., F.M. Thomas.** 2002. Effects of defoliation and drought stress on biomass partitioning and water relations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Basic Applied Ecology* **3**:171–181.
- Gilson A.** 2015. Dynamique saisonnière et répartition du Carbone et de l'Azote : de l'organe au peuplement. Rôle des réserves et effets de l'âge chez le chêne sessile (*Quercus petraea*).. Ecologie, Environnement. Université Paris Sud - Paris XI.
- Gilson A., Barthes L., Delpierre N., Dufrêne E., Fresneau C., Bazot S.** 2014. Seasonal changes in carbon and nitrogen compound concentrations in a *Quercus petraea* chronosequence. *Tree physiology* **34**: 716–29.
- Goldstein G., Andrade J.L., Meinzer F.C., et al.** 1998. Stem water storage and diurnal patterns of water use in tropical forest canopy trees. *Plant, Cell & Environment* **21**: 397–406.
- Gomez L., Faurobert M.** 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of experimental botany* **53**: 2431–2439.
- Granier A., Bréda N., Biron P., Villette S.** 1999. A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecological Modelling* **116**: 269–283.
- Granier A., Reichstein M., Breda N. et al.** 2007 Evidence for soil water control on carbon and water dynamics in European forests during the extremely dry year: 2003. *Agricultural and Forest Meteorology*, **143**: 123–145.
- Granier A., Bréda N., Longdoz B., Gross P., Ngao J.** 2008. Ten years of fluxes and stand growth in a young beech forest at Hesse, North-eastern France. *Annals of Forest Science* **65**: 704–704.
- Grassi G., Magnani F.** 2005. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment* **28**: 834–849.

- Grassi, G., P. Millard, R. Wendler, G. Minotta, and M. Tagliavini.** 2002. Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N re-mobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1689-1699.
- Grassi G., Millard P., Gioacchini P., Tagliavini M.** 2003. Recycling of nitrogen in the xylem of *Prunus avium* trees starts when spring remobilization of internal reserves declines. *Tree physiology* **23**: 1061–1068.
- Green J.J., Dawson L.A., Proctor J., Duff E.I., Elston D.A.** 2005 Fine root dynamics in a tropical rain forest is influenced by rainfall. *Plant Soil* **276**: 23–32.
- Greenwood S., Ruiz-Benito P., Martínez-Vilalta J., et al.** 2017. Tree mortality across biomes is promoted by drought intensity, lower wood density and higher specific leaf area. *Ecology Letters* **20**: 539–553.
- Gregersen P.L., Holm P.B., Krupinska K.** 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**: 37–49.
- Gruber A., Pirkebner D., Florian C., Oberhuber W.** 2012 No evidence for depletion of carbohydrate pools in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) under drought stress. *Plant Biology* **14**:142–148.
- Gruber B.D., Giehl R.F.H., Friedel S., von Wirén N.** 2013. Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant physiology* **163**: 161–79.
- Gu, L., Pallardy, S.G., Hosman, K.P., Sun, Y.** 2015. Predictors and mechanisms of the drought-influenced mortality of tree species along the isohydric to anisohydric continuum in a decade-long study of a central US temperate forest. *Biogeoscience Discussion*, **12**: 1285–1325.
- Guak S., Neilsen D., Millard P., Wendler R., Neilsen G.H.** 2003. Determining the role of N remobilization for growth of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem-sap N flux. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2121–2131.
- Gustafson E.J.** 2014. Applicability of predictive models of drought-induced tree mortality between the midwest and northeast United States. *Forest Science* **60**: 327–334.
- Hacke, U., J.J. Sauter.** 1996. Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. *Oecologia* **105**: 425–439.
- Hai-Yang Z., Xiao-Tao L., Hartmann H., et al.** 2018. Foliar nutrient resorption differs between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal trees at local and global scales. *Global Ecology and Biogeography* **27**.
- Hansen J., Møller I.** 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry* **68**: 87–94.
- Hanson, P.J., Weltzin, J.F.,** 2000. Drought disturbance from climate change: response of United States forests. *The Science of the Total Environment* **262**: 205-220
- Herms D.A., Mattson W.J.** 1992 The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**: 282–335.
- Harrison K.A., Bol R., Bardgett R.D.** 2008. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 228–237.

- Hartmann H., Ziegler W., Trumbore S.** 2013. Lethal drought leads to reduction in nonstructural carbohydrates in Norway spruce tree roots but not in the canopy. *Functional Ecology* **27**: 413–427.
- Hartmann H.** 2015 Carbon starvation during drought-induced tree mortality are we chasing a myth? *Journal of Plant Hydraulics* **2**: 500-505.
- Hartmann H., Trumbore S.** 2016. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist*. **43**: 46-59
- Hartmann H., Moura C., Anderegg W., et al.** 2018. Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. *New Phytologist*: **51**: 15–28.
- He P., Osaki M., Takebe M., Shinano T., Wasaki J.** 2005. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1117–1128.
- He X., Xu M., Qiu G.Y., Zhou J.** 2009. Use of ¹⁵N stable isotope to quantify nitrogen transfer between mycorrhizal plants. *Journal of Plant Ecology* **2**: 107–118.
- Henschel R., Rosner S., Kayler Z.E., Andreassen K., Børja I., Solberg S., Tveito O.E., Priesack E., Gessler A.** 2014. Norway spruce physiological and anatomical predisposition to dieback. *Forest Ecology and Management* **322**:27–36.
- Henschel R., Hommel R., Poschenrieder W., et al.** 2016. Stomatal conductance and intrinsic water use efficiency in the drought year 2003 - A case study of a well-established forest stand of European beech. *Trees* **30**: 153–174.
- Hill-Cottingham D.G., Lloyd-Jones C.P.** 1975 Nitrogen-15 in apple nutrition investigations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **26**: 165–173.
- Himelblau E., Amasino R.M.** 2001. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1317–1323.
- Hinckley, T.M., Bruckerhoff, D.N.,** 1975. The effects of drought on water relations and stem shrinkage of *Quercus Alba*. *Canadian Journal Botany* **53**: 62–72.
- Hoch G., Richter A., Korner C.** 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment* **26**: 1067–1081.
- Hoch G.** 2007. Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology* **21**: 823–834.
- Hoch G.** 2015 Carbon reserves as indicators for carbon limitation in trees. In: Lu¨ttge U, Beyschlag W, Cushman J (eds) *Progress in Botany*, **76**: 321–346.
- Högberg P., Högberg M.N., Göttlicher S.G.** 2008 High temporal resolution tracing of photosynthate carbon from the tree canopy to forest soil microorganisms. *New Phytology* **177**: 220–228.
- Holbrook, N.M.,** 1995. Stem water storage. In: Gartner, B.L. (Ed.), *Plant stems: physiological and functional morphology*. Academic Press, San Diego, pp. 151–174.
- Holden S.R., Gutierrez A, Treseder K.K.** 2013 Changes in soil fungal communities, extracellular enzyme activities, and litter decomposition across a fire chronosequence in Alaskan boreal forests. *Ecosystems* **16**: 34–46.

- Hölttä T., Cochard H., Nikinmaa E., Mencuccini M.** 2009. Capacitive effect of cavitation in xylem conduits: Results from a dynamic model. *Plant, Cell and Environment* **32**: 10–21.
- Hsiao T.C., Acevedo E., Fereres E., Henderson D.W.** 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* **273**, 479–500. Jensen.
- Hsiao, T.C.** 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Biology* **24**: 519–570.
- Huntingford, C., Zelazowski, P., Galbraith, D., Mercado, L.M., Sitch, S., Fisher, R. et al.** 2013. Simulated resilience of tropical rainforests to CO₂- induced climate change. *Nature Geoscience*, **6**: 268–273.
- Hyvonen R., Agren G.I., Linder S., et al.** 2007. The likely impact of elevated [CO₂], nitrogen deposition, increased temperature and management on carbon sequestration in temperate and boreal forest ecosystems: a literature review. *New Phytologist* **173**: 463–480.
- Inventaire Forestier National (IFN)** 2013 Le mémento. http://inventaire-forestier.ign.fr/spip/IMG/pdf/memento_2013.pdf.
- IPCC** 2013 Climate change 2013 - the physical Science basis. In: Stocker D, Qin TF, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds) Contribution of Working Group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, pp 159–254.
- IPCC.** 2018. Global Warming of 1.5°C. Summary for Policymakers.
- Jackson R.B., Mooney H.A., Schulze E.D.** 1997 A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. *Plant National Academic Science USA* **94**: 7362–7366.
- Jacquet J-S** 2012. Impacts des défoliations de la processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*) sur la croissance du pin maritime (*Pinus pinaster*). École Doctorale: Sciences et Environments Ph.D.: 151.
- Janská A., Maršík P., Zelenková S., Ovesná J.** 2010 Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* **12**: 395–405.
- Jarvis S., Macduff J.** 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I recovery of uptake and growth and their interactions. *Journal of Experimental Botany* **40**: 965–975.
- Johnson, S. N., Erb, M., Hartley, S. E.** 2016 Roots under attack: Contrasting plant responses to below- and aboveground insect herbivory. *New Phytologist*, **210**: 413–418.
- Jordan M.O., Wendler R., Millard P.** 2012. Autumnal N storage determines the spring growth, N uptake and N internal cycling of young peach trees. *Trees-Structure and Function* **26**: 393-404.
- Jordan M.O.,** 2015. C depletion and tree dieback in young peach trees : a possible consequence of N shortage ? *Annals of forest science* **5**: 529:537.
- Jourdan, J.** 1980. Variations saisonnières de la morphogénèse et de la croissance des systèmes aériens et souterrains chez le peuplier. Leurs relations avec les glucides et les transferts minéraux (Thèse, Grenoble : Faculté des Sciences), pp. 160.
- Jump A.S., Mátyás C., Peñuelas J.** 2009 The altitude-for-latitude disparity in the range retractions of woody species. *Trends in Ecology and Evolution* **24**: 694–701.

- Kang S.M., Ko K.C., Titus J.S.** 1982 Mobilization and metabolism of protein and soluble nitrogen during spring growth of apple-trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**: 209–213.
- Kawaletz, H., Mölder, I., Annighöfer, P., Terwei, A., Zerbe, S., Ammer, C.,** 2014. Pot experiments with woody species a review. *Forestry* **87**: 482–491.
- Keel S.G., Schädel C.** 2010 Expanding leaves of mature deciduous forest trees rapidly become autotrophic. *Tree Physiology* **30**:1253–1259.
- Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H.** 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1399–1409.
- Kiba T., Krapp A.** 2016. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant and Cell Physiology* **57**: 707–714.
- Killingbeck K.T.** 1996 Nutrients in senesced leaves: Keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* **77**: 1716–1727.
- King A.W., Post W.M., Wullschlegler S.D.** 1997 The potential response of terrestrial carbon storage to changes in climate and atmospheric CO₂. *Climatic Change*, **35**: 199– 227
- Klein, I., Weinbaum S.A.** 1984. Foliar application of urea to olive: translocation of urea nitrogen as influenced by sink demand and nitrogen deficiency. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**: 356–360.
- Klein T., Hoch G., Yakir D., Körner C.** 2014. Drought stress, growth and nonstructural carbohydrate dynamics of pine trees in a semi-arid forest. *Tree Physiology* **34**: 981–992.
- Knoblauch, M., Peters, W.S.,** 2010. Münch, morphology, microfluidics - our structural problem with the phloem: Münch, morphology, microfluidics. *Plant Cell Environment*. **33**: 1439–1452.
- Knoche M., Petracek P.D., Bukovac M.J., Shafer W.E.** 1994. Urea Penetration of Isolated Tomato Fruit Cuticles. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119**: 761–764.
- Kolb, T.E., Dodds K.A., Clancy K.M.** 1999. Effect of western spruce budworm defoliation on the physiology and growth of potted Douglas-fir seedlings. *Forest Science* **45**: 281–291.
- Körner C.** 2003. Carbon limitation in trees. *Journal of Ecology* **91**: 4–17.
- Kosola K.R., Dickmann D.I., Paul E.A., Parry D.** 2001. Repeated insect defoliation effects on growth, nitrogen acquisition, carbohydrates, and root demography of poplars. *Oecologia* **129**: 65–74.
- Kozlowski T.T., Pallardy S.G.** 1997. Physiology of woody plants. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Kramer, P. J., Kozlowski T.T.** 1979. Physiology of woody plants. Academic Press, New York, New York, USA.
- Kramer K., Degen B., Buschbom J., Hickler T., Thuller W., Sykes M.T., de Winter T.** 2010 Modelling exploration of the future of European beech (*Fagus sylvatica L.*) under climate change – range, abundance, genetic diversity and adaptive response. *Forest Ecology and Management* **259**: 2213-2222.

- Krause G.H.M., Arndt U., Brandt C.J.** 1986 Forest decline in Europe: development and possible causes. *Water, Air and Soil Pollution* **31**:647–668.
- Krause S., Raffa K., Wagner M.** 1993. Tree responses to stress: a role in sawfly outbreaks? In: M Wagner, K Raffa eds. Sawfly life history adaptations to woody plants. San Diego: Academic Press, 211–227.
- Kreuzwieser J., Gessler A.** 2010. Global climate change and tree nutrition: Influence of water availability. *Tree Physiology* **30**: 1221–1234.
- Kulac S., Nzokou P., Guney D., Cregg B.M., Turna I.** 2012. Growth and physiological response of Fraser fir [*Abies fraseri* (Pursh) Poir.] seedlings to water stress: seasonal and diurnal variations in photosynthetic pigments and carbohydrate concentration. *HortScience* **47**: 1512–1519.
- Kulman H.M.** 1971. Effects of insect defoliation on growth and mortality of trees. *Annual Review of Entomology* **16**: 289–324.
- Lacointe, A., Kajji, A., Daudet, F.A., Archer, P., Frossard, J.S.** 1993. Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. *Acta Botanica Gallica* **140**: 435-441.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M.** 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 569–593.
- Larter M., Pfautsch S., Domec J-C, Trueba S., Nagalingum N., Delzon S.** 2017 Aridity drove the evolution of extreme embolism resistance and the radiation of conifer genus *Callitris*. *New Phytologist* **215**: 97–112.
- Lavorel S., Lebreton J-D, Le Maho Y.** 2017. Les mécanismes d’adaptation de la biodiversité aux changements climatiques et leurs limites.
- Lebourgeois F., Bréda N., Ulrich E., Granier A.** 2005. Climate-tree-growth relationships of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the French Permanent Plot Network (RENECOFOR). *Trees - Structure and Function* **19**: 385–401.
- Lebourgeois F., Pierrat J-C, Perez V.** 2010 Simulating phenological shifts in French temperate forests under two climatic change scenarios and four driving global circulation models. *International Journal of Biometeorology* **54**: 563–581.
- Lemoine, D., Cochard, H., Granier, A.** 2002 Within crown variation in hydraulic architecture in beech (*Fagus sylvatica* L): evidence for a stomatal control of xylem embolism. *Annals of Forest Science* **59**: 19–27.
- Leuschner C., Backes K., Hertel D., et al.** 2001. Drought responses at leaf, stem and fine root levels of competitive *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. trees in dry and wet years. *Forest Ecology and Management* **149**: 33–46.
- Li M.H., Hoch G., Korner C.** 2002 Source/sink removal affects mobile carbohydrates in *Pinus cembra* at the Swiss treeline. *Trees Structure and Function* **16**: 331–337.
- Li J., Powell T.L., Seiler T.J., Johnson D.P., Anderson H.P., et al.** 2007. Hurricane Frances on Florida scrub-oak ecosystem processes: defoliation, net CO₂ exchange and interactions with elevated CO₂. *Global Change Biology* **13**: 1101–1113.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G.** 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 115–136.

- Linton M.J., Sperry J.S., Williams D.G.** 1998. Limits to water transport in *Juniperus osteosperma* and *Pinus edulis*: implications for drought tolerance and regulation of transpiration. *Functional Ecology* **12**: 906–911.
- Liu Y., Chen X., Ouyang A.** 2008. Nondestructive determination of pear internal quality indices by visible and near-infrared spectrometry. *LWT - Food Science and Technology* **41**: 1720–1725.
- Liu B., He J.X., Zeng F.J., Lei J.Q., Arndt S.K.** 2016 Life span and structure of ephemeral root modules of different functional groups from a desert system. *New Phytologist* **211**:103–112.
- Liu J., Arend M., Yang W., et al.** 2017. Effects of drought on leaf carbon source and growth of European beech are modulated by soil type. *Nature Publishing Group*: **7**: 1–9.
- Llácer, G.** 2006. Hosts and symptoms of plum pox virus: Herbaceous hosts. *EPPO Bulletin*, **36**: 227–228.
- Lloret F., Peñuelas J., Estiarte M.** 2004 Experimental evidence of reduced diversity of seedlings due to climate modification in a Mediterranean-type community. *Global Change Biology* **10**: 248–258.
- Lloret F., Escudero A., Iriondo J.M., Martinez-Vilalta J., Valladares F.** 2012. Extreme climatic events and vegetation: the role of stabilizing processes. *Global Change Biology* **18**: 797–805.
- Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A. and Herrera-Estrella, L.** 2003 The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 280–287.
- Lorenz, M., Becher, G.** 2012 Forest Condition in Europe, 2012 Technical Report of ICP Forests. Work Report of the Thunen Institute for World Forestry 2012/1. ICP Forests.
- Loustau D.** 2010. Forests, carbon cycle and climate change, QUAE, Versailles, 350 pp.
- Loustau D., Bosc A.** 2012. Contraintes climatiques sur les forêts. *Innovations Agronomiques* **18**. 71-86.
- Lovett G.M., Christenson L.M., Groffman P.M., Jones C.G., Hart J.E., Mitchell M.J.** 2002. Insect defoliation and nitrogen cycling in forests. *BioScience* **52**: 335–341.
- Lu, X., Freschet, G. T., Flynn, D. F., Han, X.** 2012. Plasticity in leaf and stem nutrient resorption proficiency potentially reinforces plant- soil feedbacks and microscale heterogeneity in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology* **100**: 144–150.
- Luo J., Li H., Liu T., Polle A., Peng C., Luo Z-B.** 2013. Nitrogen metabolism of two contrasting poplar species during acclimation to limiting nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4207–4224.
- Lynch J.M., Whipps J.M.** 1990 Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**:1–10.
- Macaduff J.H., Jarvis S.C., Mosquera A.** 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation: II. Assimilation of NO₃ and/or short-term effects on NO₃ uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**: 977–984.
- Magnani F., Borghetti M.** 1995. Interpretation of Seasonal-Changes of Xylem Embolism and Plant Hydraulic Resistance in *Fagus-Sylvatica*. *Plant Cell and Environment* **18**: 689–696.

- Maguire A.J., Kobe R.K.** 2015. Drought and shade deplete nonstructural carbohydrate reserves in seedlings of five temperate tree species. *Ecology and Evolution* **5**: 5711–5721.
- Malaguti D., Millard P., Wendler R., Hepburn A., Tagliavini M.** 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *Journal of experimental botany* **52**: 1665–1671.
- Manion P.D.** 1981 Tree disease concepts. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Manrique-alba À., Sevanto S., Adams H.D., et al.** 2018. Stem radial growth and water storage responses to heat and drought vary between conifers with differing hydraulic strategies. *Plant Cell and Environment*. **41**: 1926–1934.
- Martínez-Vilalta J., Piñol J., Beven K.** 2002 A hydraulic model to predict drought-induced mortality in woody plants: an application to climate change in the Mediterranean. *Ecological Modelling* **155**: 127–147.
- Martínez-Vilalta J., Lloret F., Breshears D.D.** 2012. Drought-induced forest decline: causes, scope and implications. *Biology Letters* **8**: 689–691.
- Martin-StPaul N., Delzon S., Cochard H.** 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* **20**: 1437–1447.
- Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gauffichon L., Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141–1157.
- McCormack M.L., Guo D.L.** 2014 Impacts of environmental factors on fine root lifespan. *Frontiers in Plant Science* **5**: 205.
- McCormack M.L., Dickie I.A., Eissenstat D.M. et al.** 2015 Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist* **207**: 505–518.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., et al.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719–739.
- McDowell N.G., Ryan M.G., Zeppel M.J.B., Tissue D.T.** 2013. Improving our knowledge of drought-induced forest mortality through experiments, observations, and modeling. *New Phytologist* **200**: 289–293.
- McLaughlin, S.B., McConathy R.K., Barnes R.L., Edwards N.T.** 1980 Seasonal changes in energy allocation by white oak (*Quercus alba*). *Canadian Journal of Forest Research* **10**: 379–388.
- Mei L., Xiong Y., Gu J., Wang Z.** 2015. Whole - tree dynamics of non-structural carbohydrate and nitrogen pools across different seasons and in response to girdling in two temperate trees. **177**: 333–344.
- Meinzer, F.C., D.M. Johnson, B. Lachenbruch, K.A. McCulloh, D.R. Woodruff** 2009 Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* **23**: 922–930.

- Meinzer F.C.** 2016 Stomatal kinetics and photosynthetic gas exchange along a continuum of iso- to anisohydric regulation of plant water status. *Plant Cell and Environment* **40**: 1618-1628.
- Meir, P., Mencuccini, M., Dewar, R.C.** 2015. Drought-related tree mortality: addressing the gaps in understanding and prediction. *New Phytologist*, **207**: 28–33.
- Mencuccini M.** 2014 Temporal scales for the coordination of tree carbon and water economies during droughts. *Tree Physiology* **34**: 439–442.
- Michelot, A., Simard, S., Rathgeber, C., Dufrêne, E., Damesin, C.** 2012. Comparing the intra-annual wood formation of three European species (*Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris*) as related to leaf phenology and non-structural carbohydrate dynamics. *Tree Physiology* **32**: 1033-1045.
- Migliavacca M., Sonnentag O., Keenan T.F. et al.** 2012 On the uncertainty of phenological responses to climate change, and implications for a terrestrial biosphere model. *Biogeosciences* **9**:2063–2083.
- Millard P., Neilsen G.H.** 1989. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilisation of stored N for the seasonal growth of apple trees. *Annals of Botany* **63**: 301–308.
- Millard P., Proe M.F.** 1991. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. *New Phytologist* **117**: 587–596.
- Millard P., Hester A., Wendler R., Baillie G.** 2001. Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. *Functional Ecology* **15**: 535-543.
- Millard P., Sommerkorn M., Grelet G.A.** 2007. Environmental change and carbon limitation in trees: a biochemical, ecophysiological and ecosystem appraisal. *New Phytologist* **175**: 11–28.
- Millard P., Grelet G.A.** 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: Ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology* **30**: 1083–1095.
- Millard P.** 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell and Environment* **11**: 1–8.
- Millard P.** 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **159**: 1–10.
- Millett, J., Millard P., Hester A.J., McDonald A.J.S.** 2005. Do competition and herbivory alter the internal nitrogen dynamics of birch saplings? *New Phytologist*. **168**: 413–422.
- Mitchell P.J., O’Grady A.P., Tissue D.T., White D.A., Ottenschlaeger M.L., Pinkard E.A.** 2013. Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist* **197**: 862–872.
- Mooney H.A., Hays R.I.** 1973. Carbohydrate storage cycles in two Californian Mediterranean-climate trees. *Flora* **162**: 295–304.
- Moran E., Lauder J., Musser C., Stathos A., Shu M.** 2017. The genetics of drought tolerance in conifers. *New Phytologist* **216**: 1034–1048.

- Muhr J., Angert A., Negrón-Juárez R.I., Muñoz W., Kraemer G., Chambers J.Q., Trumbore S.E.** 2013 Carbon dioxide emitted from live stems of tropical trees is several years old. *Tree Physiology* **33**: 743–752.
- Muller B., Pantin F., Génard M., Turc O., Freixes S., Piques M., Gibon Y.** 2011 Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1715–1729.
- Münch E.** 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena: Gustav Fischer.
- Nabeshima E., Murakami M., Hiura T.** 2001. Effects of herbivory and light conditions on induced defense in *Quercus crispula*. *Journal of Plant Research* **114**: 403–409.
- Nabuurs, G. J., Schelhaas M. J., Mohren G. M. J., Field C. B.** 2003. Temporal evolution of the European forest sector carbon sink from 1950 to 1999. *Global Change Biology* **9**:152–160.
- Nageleisen L.M., Piou D., Saintonge F.X, Riou-Nivert P.,** 2010. La santé des forets, Maladies, insectes, accidents climatiques ... diagnostic et prévention.
- Nahm M., Matzarakis A., Rennenberg H., Gessler A.** 2007. Seasonal courses of key parameters of nitrogen, carbon and water balance in European beech (*Fagus sylvatica* L.) grown on four different study sites along a European North-South climate gradient during the 2003 drought. *Trees - Structure and Function* **21**: 79–92.
- Nair R.K.F., Perks M.P., Weatherall A. et al.** 2015. Does canopy nitrogen uptake enhance carbon sequestration by trees? *Global Change Biology*: **22**: 875–888.
- Nardini A., Battistuzzo M., Savi T.** 2013. Shoot desiccation and hydraulic failure in temperate woody angiosperms during an extreme summer drought. *The New Phytologist* **200**: 322–329.
- Neilsen D., Millard P., Neilsen G.H., Hogue E.J.** 1997. Sources of N for leaf growth in a high-density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. *Tree physiology* **17**: 733–739.
- Nelson, E.A., Dickson, R.E.** 1981. Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. *Canadian Journal of Forest Research* **11**: 145-154.
- Netherer S., Matthews B., Katzensteiner K., et al.** 2015. Do water-limiting conditions predispose Norway spruce to bark beetle attack? *New Phytologist* **205**: 1128–1141.
- Nikinmaa E., Hölttä T., Hari P., Kolari P., Mäkelä A., Sevanto S., Vesala T.** 2013. Assimilate transport in phloem sets conditions for leaf gas exchange. *Plant, Cell and Environment* **36**: 655–669.
- Nolf M., Lopez R., Peters J.M.R., et al.** 2017. Visualization of xylem embolism by X-ray microtomography: a direct test against hydraulic measurements. *New Phytologist* **214**: 890–898.
- O'Brien, M.J., Burslem, D.F.R.P., Caduff, A., Tay, J., Hector, A.,** 2015. Contrasting nonstructural carbohydrate dynamics of tropical tree seedlings under water deficit and variability. *New Phytologist* **205**: 1083–1094.
- O'Brien, M. J., Engelbrecht, B. M. J., Joswig, J., Pereyra, G., Schuldt, B., Jansen, S. Macinnis-Ng, C.** 2017 A synthesis of tree functional traits related to drought-induced mortality in forests across climatic zones. *Journal of Applied Ecology*. **54**: 1669-1686.

- O'Kenney, B.T., Hennerty M.J., Titus J.S.** 1975. Changes in the nitrogen reserves of apple shoots during the dormant season. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **50**: 321–329.
- Ögren E.** 2000 Maintenance respiration correlates with sugar but not nitrogen concentration in dormant plants. *Physiology Plant* **108**: 295–299.
- Oliva J., Stenlid J., Martínez-Vilalta J.** 2014. The effect of fungal pathogens on the water and carbon economy of trees: implications for drought-induced mortality included in theoretical models for drought induced mortality. *New Phytologist* **203**: 1028–1035.
- Ortega-Loeza, M.M., Salgado-Garciglia R., Gomez-Alonso C., Avila Diaz I.** 2011: Acclimatization of the endangered mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa*. *European Journal of Environmental Sciences*, **1**: 48–54.
- Ourry A., Macduff J.H., Volenec J.J., Gaudillere J.P.** 2001 Nitrogen traffic during plant growth and development. In: Morot-Gaudry JF, Lea P Plant nitrogen. Springer, Berlin, pp 255–273.
- Ozolincius, R., Stakenas, V.** 1996 Tree crown defoliation: influencing factors. *Baltic Forestry*, **2**: 48–55.
- Palacio S., Hester A.J., Maestro M., Millard P.** 2008. Browsed *Betula pubescens* trees are not carbon-limited. *Functional Ecology* **22**: 808–815.
- Palacio S., Hernández R., Maestro-Martínez M., Camarero J.J.** 2012. Fast replenishment of initial carbon stores after defoliation by the pine processionary moth and its relationship to the re-growth ability of trees. *Trees - Structure and Function* **26**: 1627–1640.
- Palacio S., Hoch G., Sala A., Körner C., Millard P.** 2014. Does carbon storage limit tree growth? *New Phytologist* **201**: 1096–1100.
- Palacio S., Camarero J.J., Maestro M., Alla A.Q., Lahoz E., Montserrat-Martí G.** 2018. Are storage and tree growth related? Seasonal nutrient and carbohydrate dynamics in evergreen and deciduous Mediterranean oaks. *Trees - Structure and Function* **32**: 1–14.
- Pangle, R. E., Limousin, J. M., Plaut, et al.** 2015. Prolonged experimental drought reduces plant hydraulic conductance and transpiration and increases mortality in a piñon–juniper woodland. *Ecology and evolution* **5**: 1618–1623.
- Pantin F., Fanciullino A-L, Massonnet C., Dauzat M., Simonneau T., Muller B** 2013 Buffering growth variations against water deficits through timely carbon usage. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–11.
- Parsons A., Leafe E., Collett B., Stiles W.** 1983. The physiology of grass production under grazing. I. Characteristics of leaf and canopy photosynthesis of continuously-grazed swards. *Journal of Applied Ecology*: **20**: 117–126.
- Patakas A., Nikolaou N., Zioziou E., Radoglou K., Noitsakis B.** 2002 The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science* **163**: 361–367.
- Peek M.S.** 2007 Explaining variation in fine root life span. In: Esser K, Lo'ttge U, Beyschlag W, Murata J (eds) Progress in Botany. Springer, Berlin, pp 382–398.

- Penning de Vries F.W.T.** 1975 The Cost of Maintenance Processes in Plant Cells. *Annals of Botany* **39**: 77–92.
- Peñuelas J.J., Rosas T., Galiano L., Ogaya R., Peñuelas J.J., Martínez-Vilalta J.** 2013. Dynamics of non-structural carbohydrates in three Mediterranean woody species following long-term experimental drought. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–16.
- Peuke A.D., Rennenberg H.** 2004 Carbon, nitrogen, phosphorus, and sulphur concentration and partitioning in beech ecotypes (*Fagus sylvatica* L.): phosphorus most affected by drought. *Trees – Structure and Function* **18**: 639–648.
- Peuke D., Schraml C., Hartung W., Rennenberg H.** 2002. Identification of drought-sensitive beech ecotypes by physiological parameters. *New Phytologist* **154**: 373–387.
- Piene H., Little C.H.A.** 1990. Spruce budworm defoliation and growth loss in young balsam fir: artificial defoliation of potted trees. *Canadian Journal of Forest Research* **20**: 902–909.
- Pinkard E. A., Battaglia M., Roxburgh S., O'Grady A. P.** 2011. Estimating forest net primary production under changing climate: adding pests into the equation. *Tree physiology*. **31**: 686-699.
- Piovesan G., Biondi F., Filippo A., Alessandrini A., Maugeri M.** 2008 Drought-driven growth reduction in old beech (*Fagus sylvatica* L.) forests of the central Apennines, Italy. *Global Change Biology* **14**: 1-17.
- Piper F.I.** 2011 Drought induces opposite changes in the concentration of non-structural carbohydrates of two evergreen Nothofagus species of differential drought resistance. *Annals of Forest Science* **68**: 415–424.
- Piper F.I.** 2015. Patterns of carbon storage in relation to shade tolerance in southern South American species. *American Journal of Botany* **102**: 1442–1452.
- Piper F.I., Fajardo A.** 2016. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. *Tree Physiology*. **36**: 1400-1408.
- Piper F.I., Fajardo A.** 2014. Foliar habit, tolerance to defoliation and their link to carbon and nitrogen storage. *Journal of Ecology* **102**: 1101–1111.
- Pittermann, J.** 2010. The evolution of water transport in plants: an integrated approach. *Geobiology*. **8**:112-139.
- Poorter, H., Fiorani, F., Stitt, M., Schurr, U., Finck, A., Gibon, Y., Pons, T. L.** 2012. The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biology* **39**: 821-838.
- Pratt R.B., Jacobsen A.L., Mohla R., Ewers F.W., Davis S.D.** 2008. Linkage between water stress tolerance and life history type in seedlings of nine chaparral species (Rhamnaceae). *Journal of Ecology* **96**: 1252–1265.
- Preece C., Farré-Armengol G., Llusà J., Peñuelas J.** 2018. Thirsty tree roots exude more carbon. *Tree Physiology*. **38**: 690-695.
- Puri E., Hoch G., Korner C.** 2015. Defoliation reduces growth but not carbon reserves in Mediterranean *Pinus pinaster* trees. *Trees* **29**: 1187–1196.

- Quentin, A.G., O'Grady, A.P., Beadle, C.L., Worledge, D., Pinkard, E.A.,** 2011. Responses of transpiration and canopy conductance to partial defoliation of Eucalyptus globulus trees. *Agricultural and Forest Meteorology* **151**: 356–364.
- Quentin AG, Pinkard EA, Ryan MG, et al.** 2015. Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology* **100**: 1-20.
- Raven J.A., Andrews M.** 2010 Evolution of tree nutrition. *Tree Physiology* **30**:1050–1071.
- Regier N., Streb S., Zeeman S.C., Frey B.** 2010. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* x *nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiology* **30**: 979–987.
- Reichenbacher, R.R., Schultz, R.C., Hart, E.R.** 1996 Artificial defoliation effect on *Populus* growth, biomass production, and total nonstructural carbohydrate concentration. *Environmental Entomology* **25**: 632–642.
- Rennenberg H., Kreutzer K., Papen H., Weber P.** 1998 Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) forests. *New Phytologist* **139**: 71–86.
- Rennenberg H., Seiler W., Matyssek R., Gessler A., Kreuzwieser J.** 2004 European beech (*Fagus sylvatica* L.) - a forest tree without future in the south of Central Europe? *Allgemeine Forst Und Jagdzeitung* **175** : 210–224.
- Rennenberg H., Loreto F., Polle A., et al.** 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* **8**: 556–571.
- Rennenberg, H., Dannenmann M., Gessler A., Kreuzwieser J., Simon J., Papen H..** 2009. Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology* **11**: 4-23.
- Reyer C.P.O., Brouwers N., Rammig A.,** 2015. Forest resilience and tipping points at different spatio-temporal scales: approaches and challenges. *Journal of Ecology* **103**: 5–15.
- Richardson A.D., Carbone M.S., Keenan T.F., et al.** 2013. Seasonal dynamics and age of stemwood nonstructural carbohydrates in temperate forest trees. *New Phytologist* **197**: 850–861.
- Roche J., Turnbull M.H., Guo Q., et al.** 2017. Coordinated nitrogen and carbon remobilization for nitrate assimilation in leaf, sheath and root and associated cytokinin signals during early regrowth of *Lolium perenne*. *Annals of Botany* **119**: 1353–1364.
- Rosecrance, R.C., R.S. Johnson, Weinbaum S.A.** 1998. The effect of timing of post-harvest foliar urea sprays on nitrogen absorption and partitioning in peach and nectarine trees. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**: 856–861.
- Rowland, L., da Costa, A.C.L., Galbraith, D.R., et al.** 2015. Death from drought in tropical forests is triggered by hydraulics not carbon starvation. *Nature*, **528**: 119–121.
- Ruehr N.K., Offermann C.A., Gessler A.,** 2009 Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO₂ efflux. *New Phytologist* **184**: 950–961.
- Ruffault J., Martin-StPaul N.K., Rambal S., Mouillot F.** 2013. Differential regional responses in drought length, intensity and timing to recent climate changes in a Mediterranean forested ecosystem. *Climatic Change* **117**: 103– 117.

- Ryan M.G.** 2011. Tree responses to drought. *Tree Physiology* **31**: 237–239.
- Sade N., del Mar Rubio-Wilhelmi M., Umnajkitikorn K., Blumwald E.** 2017. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **69**: 845–853.
- Sakai, A., Larcher, W.** 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. (Berlin: Springer Verlag).
- Sala A., Piper F., Hoch G.** 2010. Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytologist* **186**: 274–281.
- Sala A., Woodruff D.R., Meinzer F.C.** 2012. Carbon dynamics in trees: Feast or famine? *Tree Physiology* **32**: 764–775.
- Salleo, S., Lo Gullo M.A., De Paoli D., Zippo M.** 1996. Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Lauris nobilis*: a possible mechanism. *New Phytologist* **132**: 47–56.
- Salmon, Y., Torres-Ruiz, J. M., Poyatos, R., Martinez-Vilalta, J., Meir, P., Cochard, H., Mencuccini, M.** 2015. Balancing the risks of hydraulic failure and carbon starvation: a twig scale analysis in declining Scots pine. *Plant, Cell and Environment* **38**: 58–72.
- Sauter, J.J., Ambrosius, T.** 1986. Changes in Partitioning of Carbohydrates in the Wood during Bud Break in *Betula pendula* Roth. *Journal of Plant Physiology*. **124**: 31–43.
- Sauter J.J., Vancleve B., Wellenkamp S.** 1989. Ultrastructural and biochemical results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of the other tree species. *Holzforschung* **43**: 1–6.
- Sauter, J.J.** 1967. Changes in starch content of different parenchyma of trees as induced by temperature. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. **56**: 340–352.
- Sauter J.J., Van Cleve B.,** 1992, Seasonal variations of amino acids in the xylem sap of “*Populus × canadensis*” and its relation to protein body mobilisation, *Trees* **6**: 26–32.
- Schadel C., Blochl A., Richter A., Hoch G.** 2009. Short-term dynamics of nonstructural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. *Tree Physiology* **29**: 901–911.
- Schäfer K.V.R., Clark K.L., Skowronski N., Hamerlynck E.P.** 2010. Impact of insect defoliation on forest carbon balance as assessed with a canopy assimilation model. *Global Change Biology* **16**: 546–560.
- Schenk H.J., Jackson R.B.** 2005 Mapping the global distribution of deep roots in relation to climate and soil characteristics. *Geoderma*, **126**: 129–140.
- Schiebold J.M-I, Bidartondo M.I., Karasch P., Gravendeel B., Gebauer G.** 2017. You are what you get from your fungi: nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Annals of Botany* **119**: 1085–1095.
- Schimpf, C., and Stosser, R.** 1984. Histochemische Untersuchungen über die jahreszeitliche Einlagerung und Verteilung von Stärke in Langtrieben beim Apfel. *Mitteilungen Klosterneuburg* **34**: 209–220.
- Schmid S., Palacio S.** 2017. Growth reduction after defoliation is independent of CO₂ supply in deciduous and evergreen young oaks. *New Phytologist*: **214**: 1479–1490.

- Schröter M., Härdtle W., von Oheimb G.** 2012. Crown plasticity and neighborhood interactions of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in an old-growth forest. *European Journal of Forest Research* **131**: 787–798.
- Secchi F., Zwieniecki M.A.** 2010 Patterns of PIP gene expression in *Populus trichocarpa* during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP1 aquaporin subfamily as moderators of the refilling process. *Plant Cell Environment* **33**: 1285–1297.
- Seidl R., Thom D., Kautz M., et al.** 2016. Forest disturbances under climate change. *Review* **7**: 395–402.
- Seppala, R., Buck, A., Katila, P.** 2009. Adaptation of Forests and People to Climate Change—A Global Assessment Report. IUFRO World Series Vol. 22. International Union of Forest Research Organizations, Helsinki, 224 pp.
- Serrana R., Vilagrosa A., Alloza J.A.** 2015. Pine mortality in southeast Spain after an extreme dry and warm year: interactions among drought stress, carbohydrates and bark beetle attack. *Trees - Structure and Function* **29**: 1791–1804.
- Sevanto S., McDowell N.G., Dickman L.T., Pangle R., Pockman W.T.** 2013. How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses. *Plant, Cell & Environment* **37**: 153–161.
- Sevanto S.** 2014. Phloem transport and drought. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1751–1759.
- Sevanto S., Xu C.** 2016. Towards more accurate vegetation mortality predictions. *Tree Physiology* **36**: 1191–1195.
- Shim, K.K., Titus J.S., Splittstoesser W.E.** 1972. The utilization of post-harvest urea sprays by senescing apple leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **97**: 592–596.
- Simon J., Dannenmann M., Gasche R., et al.** 2011. Competition for nitrogen between adult European beech and its offspring is reduced by avoidance strategy. *Forest Ecology and Management* **262**: 105–114.
- Simon J., Dannenmann M., Pena R., Gessler A.** 2017. Nitrogen nutrition of beech forests in a changing climate: Importance of plant-soil-microbe water, carbon, and nitrogen interactions. *Plant and Soil Marschner Review* **1-2**: 89–114.
- Sinclair W., Hudler G.** 1988 Tree declines: four concepts of causality. *Journal of Arboriculture* **14**: 29–35.
- Sinnott E.W.** 1918 Factors determining character and distribution of food reserve in woody plants. *Botanical Gazette* **66**: 162–175.
- Smith A.M., Stitt M.** 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment* **30**: 1126–1149.
- Sommer J., Dippold M.A., Flessa H., Kuzyakov Y.,** 2016. Allocation and dynamics of C and N within plant–soil system of ash and beech. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. **179**: 376–387.
- Spann T.M., Beede R.H., DeJong T.M.** 2008 Seasonal carbohydrate storage and mobilization in bearing and non-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Tree Physiologist* **28**: 207–213.

- Sprugel D.G., Hinckley T.M., Schaap W.** 1991. The Theory and Practice of Branch Autonomy. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 309–334.
- Staswick P.E.** 1994. Storage Proteins of Vegetative Plant Tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 303–322.
- Stepien V., Sauter J.J., Martin F.** 1994 Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 185–192.
- Stevens M.T., Kruger E.L., Lindroth R.L.** 2008. Variation in tolerance to herbivory is mediated by differences in biomass allocation in aspen. *Functional Ecology* **22**: 40–47.
- Susiluoto S., Hilasvuori E., Berninger F.** 2010 Testing the growth limitation hypothesis for subarctic Scots pine. *J Ecol* **98**: 1186–1195.
- Suzuki Y., Makino A., Mae T.** 2001. Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of rbcL and rbcS in rice leaves from emergence to senescence. *Plant, Cell and Environment* **24**: 1353–1360.
- Tagliavini, M., P. Millard, Quartieri M.** 1998. Storage of foliar-absorbed nitrogen and remobilization for spring growth in young nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. *Tree Physiology* **18**: 203–207.
- Taiz L., Zeiger E.** 1998 *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Tanner W., Beevers H.** 2001. Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? *Plant Biology* **98** : 9443–9447.
- Tegel W., Seim A., Hakelberg D., Hoffmann S., Panev M., Westphal T., Büntgen U.** 2014 A recent growth increase of European beech (*Fagus sylvatica* L.) at its Mediterranean distribution limit contradicts drought stress. *European Journal of Forest Research* **133**: 61–71.
- Teissier du Cros E., Le Tacon F., Nepveu G., et al.** 1981 *Le hêtre*, Quae. INRA, Paris.
- Thomas, F.M., Blank, R., Hartmann, G.,** 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *Forest Pathology* **32**: 277–307.
- Thorpe M.R., Minchin P.E.H.** 1996. Mechanisms of long- and short- distance transport from sources to sinks. In: Zamski E, Schaffer AA, eds. *Photoassimilate distribution in plants and crops: source–sink relationships*. New York: Dekker, 261–282.
- Titus J., Kang S.M.** 1982 Nitrogen metabolism, translocation, and recycling in apple trees. *Horticultural Reviews*, **4**: 204– 246.
- Trumbore S.** 2006 Carbon respired by terrestrial ecosystems—recent progress and challenges. *Glob Change Biology* **12**: 141–153.
- Turcotte A., Rossi S., Deslauriers A., Krause C., Morin H.** 2011 Dynamics of depletion and replenishment of water storage in stem and roots of black spruce measured by dendrometers. *Frontiers in plant science* **2**: 21.
- Tyree M.T.** 2003. Desiccation Tolerance of Five Tropical Seedlings in Panama. Relationship to a Field Assessment of Drought Performance. *Plant Physiology* **132**: 1439–1447.
- Uemura, M., G. Warren, Steponkus P.L.** 2003. Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiology* **131**: 1800–1807.

- Upadhyaya H., Sahoo L., Panda S.K.** 2013 Molecular physiology of osmotic stress in plants. In: Rout GR, Das AB (ed) *Molecular stress physiology of plants*. Springer, New York, pp 179–192.
- Urli M., Porte A.J., Cochard H., Guengant Y., Burlett R., Delzon S.** 2013 Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiospermtrees. *Tree Physiology* **33**: 672–683.
- Uscola, M., Villar-Salvador, P., Oliet, J., Warren, C.R.,** 2014. Foliar absorption and root translocation of nitrogen from different chemical forms in seedlings of two Mediterranean trees. *Environmental and Experimental Botany* **104**: 34–43.
- Valenzuela Nunez L.M.V., Gerant D., Maillard P., Breda N., Cervantes G.G., Cohen I.S.** 2011. Evidence for a 26 kDa vegetative storage protein in the stem sapwood of mature pedunculate oak. *Interciencia* **36**:142–147.
- Valenzuela Nunez, L.** 2006. Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composes azotes et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes ; effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves. PhD thesis, Henri Poincaré University, Nancy, France, 141 p.
- van der Werf G.W., Sass-Klaassen U., Mohren G.M.J.** 2007 The impact of the 2003 summer drought on the intra-annual growth pattern of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) on a dry site in the Netherlands. *Dendrochronologia* **25**: 103–112.
- Vargas R., Hasselquist N., Allen E.B., Allen M.F.** 2010. Effects of a hurricane disturbance on aboveground forest structure, arbuscular mycorrhizae and belowground carbon in a restored tropical forest. *Ecosystems* **13**: 118–28.
- Veblen T.T., Donoso C., Kitzberger T., Rebertus A.J.** 1996 Ecology of Southern Chilean and Argentinian Nothofagus forests. In: Veblen TT, Hill RS, Read J (eds) *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*. Yale University Press, New Haven, CT, pp 293–353.
- Venturas M.D., Sperry J.S., Hacke U.G.** 2017. Plant xylem hydraulics: What we understand, current research, and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**: 356–389.
- Vergutz L., Manzoni S., Porporato A., Novais R.F., Jackson R.B.** 2012 Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants. *Ecological Monographs* **82**: 205–220.
- Verheyen K.** 2013. Assessment of the functional role of tree diversity: the multi-site FORBIO experiment. *Plant Ecology and Evolution* **146**: 26–35.
- Verheyen K., Vanhellemont M., Auge H., et al.** 2016. Contributions of a global network of tree diversity experiments to sustainable forest plantations. *Ambio* **45**: 29–41.
- Villar-Salvador P., Uscola M., Jacobs D.F.** 2015. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. *New Forests* **46**: 813–839.
- Vitousek P.** 1982. Nutrient cycling and nutrient use efficiency. *The American Naturalist* **119**: 553-572.
- Vizoso, S.** 2004. Effets combinés de l’augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et du niveau de fertilisation azotée sur la gestion du carbone et de l’azote chez le chêne pédonculé (*Quercus robur*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*). Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, p. 122.

- Voltas J., Camarero J.J., Carulla D., Aguilera M., Ortiz A., Ferrio J.P.** 2013. A retrospective, dual-isotope approach reveals individual predispositions to winter-drought induced tree dieback in the southernmost distribution limit of Scots pine. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1435–1448.
- Wagner S, Berg P, Schädler G, Kunstmann H** 2013 High resolution regional climate model simulations for Germany: Part II—projected climate changes. *Climate Dynamics* **40**: 415–427.
- Wanner L.A., Junttila O.** 1999. Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **120**: 391–399.
- Warren C., McGrath J., Adams M.** 2001 Water availability and carbon isotope discrimination in conifers. *Oecologia*, **127**: 476–486.
- Warren J.M., Iversen C.M., Garten C.T. et al.** 2012 Timing and magnitude of C partitioning through a young loblolly pine (*Pinus taeda* L.) stand using ¹³C labeling and shade treatments. *Tree Physiology* **32**: 799–813.
- Watson C.A., Ross J.M., Bagnares U., Minotta G.F., Roffi F., Atkinson D., Black K.E., Hooker JE** 2000 Environmental-induced modifications to root longevity in *Lolium perenne* and *Trifolium repens*. *Annals of Botany* **85**: 397–401.
- Watson, M.A., Casper B.B.** 1984. Morphogenetic constraints on patterns of carbon distribution in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **15**: 233–258.
- Webb K.L., Burley J.W.** 1964. Stachyose Translocation in Plants. *Plant physiology* **39**: 973–7.
- Wetzel S., Demmers C., Greenwood J.S.** 1989. Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in 3 temperate hardwoods. *Planta* **178**: 275–281.
- Wildhagen H., Dürr J., Ehlting B., Rennenberg H.** 2010 Seasonal nitrogen cycling in the bark of field-grown Grey poplar is correlated with meteorological factors and gene expression of bark storage proteins. *Tree Physiology* **30**: 1096–1110.
- Wiley E., Huepenbecker S., Casper B.B., Helliker B.R.** 2013. The effects of defoliation on carbon allocation: Can carbon limitation reduce growth in favour of storage? *Tree Physiology* **33**: 1216–1228.
- Wiley E., Helliker B.** 2012 A re-evaluation of carbon storage in trees lends greater support for carbon limitation to growth. *New Phytologist* **195**: 285–289.
- Willson C.J., Manos P.S, Jackson R.B.** 2008. Hydraulic traits are influenced by phylogenetic history in the drought-resistant, invasive genus *Juniperus* (Cupressaceae). *American journal of botany* **95**: 299–314.
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., Funck, D.** 2015 Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 534.
- Withington J.M., Reich P.B., Oleksyn J., Eissenstat D.M.** 2006 Comparisons of structure and life span in roots and leaves among temperate trees. *Ecological Monographs* **76**: 381–397.
- Zang C., Hartl-Meier C., Dittmar C., Rothe A., Menzel A.** 2014 Patterns of drought tolerance in major European temperate forest trees: climatic drivers and levels of variability. *Glob Change Biology* **20**: 3767–3779.

- Zeller B., Colin-Belgrand M., Dambrine É., Martin F.** 1998. 15N partitioning and production of 15N-labelled litter in beech trees following [15N] urea spray. *Annals of forest science* **55**: 375–383.
- Zhang C., Meng S., Li Y., Su L., Zhao Z.** 2016. Nitrogen uptake and allocation in *Populus simonii* in different seasons supplied with isotopically labeled ammonium or nitrate. *Trees - Structure and Function* **30**: 2011–2018.
- Zhang C., Liu G.B., Xue S., Zhang C.S.** 2012 Rhizosphere soil microbial properties on abandoned croplands in the Loess Plateau, China during vegetation succession. *European Journal of Soil Biology* **50**: 127–136.
- Zhao J., Hartmann H., Trumbore S., Ziegler W., Zhang Y.** 2013. High temperature causes negative whole-plant carbon balance under mild drought. *New Phytologist* **200**: 330–339.
- Zimmermann J., Hauck M., Dulamsuren Ch., Leuschner C.** 2015 Climate warming-related growth decline affects *Fagus sylvatica*, but not other broad-leaved tree species in Central European mixed forests. *Ecosystems* **18**: 560–572.
- Zweifel R., Bangerter S., Rigling A., Sterck F.J.** 2012. Pine and mistletoes: How to live with a leak in the water flow and storage system? *Journal of Experimental Botany* **63**: 2565–2578.

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 Cartes de l'évolution des températures en surface observée entre 1901 et 2012. Une couleur bleue indique un déficit de température entre ces deux périodes alors qu'une couleur chaude indique une différence positive (extrait du rapport du GIEC, 2013).

Figure I.2 Figure issue de Manion (1981) illustrant la spirale du dépérissement.

Figure I.3 Proportion d'arbres morts rapportés au nombre d'arbres total recensés lors de campagnes d'inventaires, cas de *F.Sylvatica*. Source : IFN, 2013.

Figure II.1 Photographie d'un phénomène de cavitation dans un vaisseau conducteur. Source : Cochard and Delzon, 2013.

Figure II.2 Scans issus de microtomographie à rayons X de coupes transversales de tronc d'*Eucalyptus camaldulensis* sous différents potentiels hydriques négatifs illustrant la propagation des embolies (cercles noirs) lors d'une sécheresse. Source : Nolf et al. (2017).

Figure II.3 Schéma représentant l'évolution saisonnière de la mise en réserve carbonée (NSC ; composés carbonés non structuraux). La 1ère phase correspond à la chute de la quantité de NSC mise en réserve lors du débourrement pour répondre à la demande de substrat C au printemps pour la croissance des branches et du compartiment foliaire (Barbaroux et al., 2003 ; Hoch et al., 2003 ; El Zein et al., 2011 ; Bazot et al., 2013; Gilson et al., 2014). La seconde phase correspond à l'accumulation de la quantité de NSC dans l'arbre durant la saison de végétation: processus de mise en réserve (Barbaroux et al., 2003; Hoch et al., 2003; Bazot et al., 2013). A la fin de la troisième phase, la quantité de réserves carbonées dans l'arbre augmente lors de la fin de saison de végétation pour atteindre un maximum en octobre (Barbaroux et Breda, 2002). La dernière phase se trouve durant la période hivernale où la quantité de réserves carbonées décroît légèrement afin d'alimenter la maintenance hivernale (Barbaroux et al., 2003; Hoch et al., 2003; El Zein et al., 2011b; Bazot et al., 2013).

Figure II.4 : Photographie d'un stomate majoritairement fermé (a), partiellement ouvert (b) et ouvert (d). Source : Ortega-Loeza et al., 2011.

Figure II.5 : Schéma représentant l'évolution saisonnière de la mise en réserve azotée (NNSC : composés azotés non structuraux). La 1ère phase correspond à la remobilisation des protéines de réserve lors du débourrement (Gomez et Faurobert, 2002 ; Grassi et al., 2002 ; Millard et Grelet, 2010) et conversion en acides aminés pour la croissance de nouveaux organes avant que l'absorption racinaire soit effective (Gessler et al., 1998 ; El Zein et al., 2011). La 2nde phase correspond au moment où la source d'azote pour la croissance et le fonctionnement foliaire

change en faveur de l'absorption racinaire (El Zein et al., 2011), la quantité de réserves azotées est à son minimum. La 3ème phase se situe à la fin de la période de croissance, lorsque la quantité de réserves azotées dans l'arbre augmente faiblement jusqu'à la sénescence, c'est le début de la mise en réserve azotée (Staswick, 1994; Stepien et al., 1994). La 4ème phase débute durant la sénescence, l'azote contenu dans la feuille est recyclé (l'appareil photosynthétique est dégradé) et cet azote (sous forme d'acides aminés est alors transporté vers les parties pérennes de l'arbre et stocké sous forme de protéines de réserve (Sauter et al., 1989; Gessler et al., 2004). Enfin, la 5ème phase correspond à la remobilisation azotée via la résorption foliaire qui se finit au cours de l'hiver. Durant cette phase, les acides aminés sont progressivement convertis en protéines de réserve (Staswick, 1994; Stepien et al., 1994; Gomez et Faurobert, 2002; Cooke et Weih, 2005; Valenzuela Nunez et al., 2011; Bazot et al., 2013; Gilson et al., 2014).

Figure II.6 Schéma représentatif des grandes fonctions des cycles carbonés et azotés de l'arbre adapté librement de la thèse d'Angélique Gilson (2015).

Figure IV.1 Vue du dispositif expérimental en Septembre 2012 (Crédit photos : T.Paul & F.Bonne)

Figure IV.2 Photographies de la mesure en hauteur (A) et en diamètre (B) d'un arbre du dispositif. Crédit photos : C.Massonnet.

Figure IV.3 Hauteur (A) et diamètre (B) moyen des arbres de chaque bêche du dispositif en 2013, avant la mise en place des traitements, moyenne + SE, n=168 par bêche.

Figure IV.4 Etapes de l'installation du système d'exclusion de pluie. Crédits photos : C.Massonnet et P.A Chuste.

Figure IV.5 Vue satellite du dispositif expérimental avec le toit installé au-dessus de l'ensemble des arbres. Google Maps le 15/03/2017.

Figure IV.6 Schématisation (A) et photographies (B) d'une branche avant et après une défoliation d'intensité 75%. Crédit photos B : C. Massonnet.

Figure IV.7 Photographie à gauche de deux arbres, l'un défeuillé à 75% à gauche et l'autre non défeuillé à droite. La photographie à droite montre ces deux mêmes arbres défeuillés. Crédit photos : C. Massonnet.

Figure IV.8 Photographie du dispositif de suivi de teneur en eau du sol. Crédit photo : J. Levillain.

Figure IV.9 Photographies d'une partie des arbres morts durant la saison de végétation 2016. Le code donné sous chaque photo correspond à son identification unique. Crédit photo : P.A. Chuste.

Figure IV.10 Frise chronologique des prélèvements des rameaux pour la dynamique saisonnière des NSC.

Figure IV.11 Frise chronologique des prélèvements arbres entiers pour la dynamique saisonnière des NSC.

Figure IV.13 Frise chronologique des prélèvements foliaires et bois pour étudier la dynamique à court terme ^{15}N dans la branche.

Figure IV.14 Photographies de l'expérimentation de marquage sur une branche. A : Mise en place d'un sac en plastique autour de la branche à marquer afin d'éviter toute contamination environnante. B : Pulvérisation de l'azote marqué sur les feuilles au moyen d'un pulvérisateur.

Figure IV.15 Photographies des prélèvements foliaires réalisés suite à l'expérimentation de marquage sur une branche. A : Utilisation du poinçonneur afin de prélever un échantillon foliaire. B : Feuille trouée suite à l'utilisation du poinçonneur.

Figure IV.16 Schéma récapitulatif de la stratégie expérimentale de notre marquage à l'azote ^{15}N .

Figure IV.17 Photographies de l'expérimentation de marquage ^{15}N -arbre entier. A : pulvérisation de l'urée marquée sur les feuilles. B et C : Sac en plastique transparent mis en place après le marquage, percée de trous et enlevé le matin suivant le marquage.

Figure IV.18 Frise chronologique des abattages pour la répartition ^{15}N arbre entier.

Figure IV.19 Photographie du broyeur à anneau (A) et à billes (B). Crédit photo : L. Yahiaoui.

Figure IV.20 Schéma de la préparation des échantillons aux analyses isotopique par IRMS.

Figure V.1 Schematic representation of the NSC sampling experiment. Experimental schedule (A) : Three treatments were applied over three years (2014, 2015 and 2016) with control (C), defoliation (D) and soil-water-deficit (Dr.). Two intensities of defoliation were applied with 75% of removal in 2014 and 2015 and with 90% of removal in 2016. Three branches per tree (24 trees, 8 in each treatment) were randomly chosen at each date and divided into annual

growth. From 2015, twigs of dead trees were also sampled using the same procedure than living ones.

Figure V.2. Seasonal dynamics of the soil Relative Extractable Water during the growing season (REW, A) and the average of pre-dawn water potential of twigs (B) in 8-year-old beech trees since the start of the experiment in control (C), defoliated (D), soil water deficit (Dr.) treatments. Black arrows indicate the dates of the sampling. The dashed line indicate the threshold value of 40% of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al (1999). Different letters means a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date; mean \pm SE, $n=8$.

Figure V.3. Mean height (top, cm) and diameter (bottom, mm) soil water deficit (Dr.) or under defoliation (D), C is for control treatment, i.e well-watered trees and no defoliated in 2014, 2015 and 2016. Mean \pm SE. Different letters indicate significant difference between treatment for a given date while stars indicate a significant effect of time between 2014 and 2016, $n=8$.

Figure V.4. Mean (\pm SE) concentration (g.100g⁻¹DM) of starch (black) and total soluble sugars (grey) on twigs from current year of sample (A) and one-year-old twigs (B) on trees from of soil water deficit (Dr.) or under defoliation (D) since the start of the experiment. Current-year branches were only sampled at the end of each vegetative season. C is for control treatment. We sampled dead trees in October 2015 and 2016 and in June 2016. Lower lowercase bold letters indicates differences between treatments for starch concentration, middle italic letters is for soluble sugars and uppercase letters is for total NSC difference. $n=8$.

Figure V.5. Proportion (%) of differentiate sugars on current-year (A) and one-year-old (B) branches from tree under drought (Dr.) or under defoliation (D) or dead trees (Dead) since the start of the experiment, $n=8$.

Figure VI.1. Schematic representation of the ¹⁵N labeling experiment. Experimental schedule (top): Four treatments were applied over two years (2014 and 2015) with control (C), moderate (MD) and severe soil water deficit (SD) and defoliation (D) treatments (a 75% removal of the foliage, grey box). One branch per tree was labeled with enriched ¹⁵N–urea on one set of trees in spring (LAB 1) and on a second set of trees in summer (LAB 2). Sampling procedure (bottom): At day 0, unlabeled leaves were taken to determine N% and baseline ¹⁵N natural abundance. At day 0.5, a set of five leaves was hole-punched, then punched again at day 1, 2 and 4. At day 4, one intact leaf per tree was also sampled to estimate ¹⁵N assimilation into foliar proteins. At day 7, another set of five leaves was hole-punched. At day 14, all the leaves

and twigs from the labeled branch were harvested. Twigs were analyzed by annual growth unit (Y, Y-1 and <Y-1, where Y is year). In addition, leaves from the apical twigs were sampled to assess the long-distance transport of ^{15}N from the labeled leaves.

Figure VI.2. Seasonal dynamics for soil Relative Extractable Water (REW) during the growing season of 2015 (A) in 9-year-old beech trees, and average pre-dawn water potential for twigs at the time of the two labeling experiments (B) at days of year (DOY) 150, 176 and 198 in control (C), defoliation (D) and moderate (MD) and severe soil water deficit (SD) treatments. In A, grey arrows indicate the dates of the two labeling experiments (LAB1 and LAB2) and the dashed line indicates the threshold value of REW below which stomatal conductance is impacted, according to Granier et al., (1999). In B, different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) in pre-dawn twig water potential between treatments for a given date; mean, \pm SE; $n=24$.

Figure VI.3. Nitrogen (N) concentrations (% DM) in leaves collected on the labeled branches of 9-year-old beech trees in spring (top) and summer (bottom) at days 0.5, 1, 2 and 4 after labeling in the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate (MD) and severe soil water deficit (SD). In each season, a set of 12 trees per treatment was used and one branch per tree was labeled. Values are mean \pm SE, $n=12$.

Figure VI.4. Dynamics of ^{15}N concentrations ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ DM) in leaves of 9-year-old beech trees in spring (top) and summer (bottom) for 14 days after labeling in the control (C, disc), defoliation (D, triangle), moderate (MD, square) and severe soil water deficit (SD, diamond) treatments. The same five leaves from each labeled branch were hole-punched at days 0.5, 1 and 2. Then, these leaves were harvested at day 4. Five new leaves were then chosen along the labeled branch and were hole-punched at day 7. At day 14, all the foliage remaining on the branch was harvested. The same protocol was applied for both seasons (spring and summer). The effect of time after urea application was calculated only when the same leaves were used from day 0.5 to day 4 (ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). We tested the effect of season between spring and summer and significant differences were noted “season effect”. Values are mean \pm SE; $n=12$.

Figure VI.5. Biomass (A) nitrogen (B) and ^{15}N (C) allocation (%) between leaves and twigs according to annual growth unit (Y, Y-1 and <Y-1, where Y is year) on 9-year-old beech trees 14 days after ^{15}N labeling in spring and summer for the four treatments: Control (C), defoliation (D), moderate (MD) and severe soil water deficit (SD). Values are means \pm SE;

n=12. Treatment difference for a given compartment is shown with different letters ($p < 0.05$). Seasonal differences are shown with stars in the summer section (ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Figure VI.6. Long-distance transport of ^{15}N ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ DM}$) from the leaves of labeled branches to the leaves of the apical terminal twigs on 9-year-old beech trees 14 days after labeling in spring (top) and summer (bottom) for the four treatments: control (C), defoliation (D) and moderate (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for a given date; values are mean \pm SE; n=12.

Figure VII.1: Schedule of the experiment since the onset of treatments in 2014 (photography 1 and 2). The foliar labeling was made in September 2015 with urea sprayer in a fine mist (photography 3), tree bag was installed before the labeling, remained during the night after labelling then removed the morning after (photography 4). First, we made a harvest one month after the labeling to confirm that the tracer was incorporated in perennial organs via leaf N resorption. Then, harvesting was made at two key phenological dates in February and June 2016. C is for Control, D for Defoliation, MD and SD for Moderate Drought and Severe Drought respectively.

Figure VII.2. : Seasonal dynamics of the relative extractable soil water content (REW, A) and the average pre-dawn water potential of twigs (B) in young beech trees during the year 2015 and 2016 in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). The dashed line (A) indicates the threshold value of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al (1999). The star indicates the labeling time and the two arrows indicate the harvesting times. In B, different letters means a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date. Mean \pm SE, n=8 trees in C and D, 5 in MD and SD in September 2015 and 6 trees in C and D, 3 in MD and SD in June 2016 for pre-dawn water potential of twigs.

Figure VII.3 Mean height (A) and diameter (B) of the trunk at the end of the vegetative season 2015 and the mean terminal twigs (C) and lateral twigs (D) growth after the spring growth in 2016 in young beech trees in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE, n=6 for C and D and n=3 for MD and SD. Different letters mean a significant difference between treatments.

Figure VII.4. Change with time of leaf characteristics with leaf mass area (LMA; A,B), individual leaf area (C,D), total leaf area (E,F) and number of leaves per tree (G,H) at the end

of vegetative season 2015 (top) and after the spring growth 2016 (bottom) in young beech trees in four treatments : moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE. n=3 trees for MD and SD and n=6 trees for D and C. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between treatments, stars indicate significant difference between years.

Figure VII.5 15 Nitrogen concentration (mean \pm SE, %DM) in above (leaves, branches, trunk) and belowground (main roots) compartments of young beech trees in October 2015 in the four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE, n=2.

Figure VII.6. : Changes with time of N (A) and 15 N (B) concentrations (mean \pm SE, %DM) in aboveground (leave, branche, trunk) and belowground (main roots, lateral roots, fine roots) compartments of 10 year-old beech trees sampled in February and June 2016 in the four treatments : moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). Mean \pm SE. n=3 trees for MD and SD and n=6 trees for D and C. A stars means a significant season effect for a given treatment and a given compartment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Please note that leaves correspond to the marcescent leaves in February and to new leaves from new spring growth in June

Figure VII.7 Biomass (A), nitrogen (B) partitioning and 15 N (C) allocation between aboveground organs (leaves, branches, trunk) of young beech trees in February and June 2016. Each line of letters indicates significant differences between treatment for a given organ: lower black letters for trunk, middle grey letters for branches and upper letters for leaves. n=6 for C and D and n=3 for MD and SD. Note that leaves correspond to marsescent leaves in February and to new spring leaves in June.

Figure VIII.1 Schedule of the experiment (top) since the onset of treatments in 2014. Dead trees were harvested in June and October 2016 while living trees were harvested in October 2015, June 2016 and October 2016. Schema (bottom left) of the sampled organs taken on each harvested tree. Twigs were taken as triplicate.

Figure VIII.2 Seasonal dynamics of the relative extractable soil water content (REW, A) and the average pre-dawn twigs water potentials (B) in 10-year-old beech trees during the year 2015 and 2016 under soil water deficit (Dr.) and irrigation (C). The dashed line indicate the threshold value of REW from which the stomatal conductance is impacted according to Granier et al (1999). Black arrows indicate the time when harvest were done. Different letters means a

significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given date. Mean \pm SE, $n=6$ in October 2015 and June 2016 and $n=4$ in October 2016.

Figure VIII.3 Mean height (cm) and diameter (mm) of young-old beech trees under soil water deficit (Dr.) or normal irrigation (C). Mean \pm SE, $n=336$.

Figure VIII.4 Dynamic of tree survival in the soil water deficit treatment during the three years of the experiment. The control treatment presented no mortality. $N=336$.

Figure VIII.5 Mean concentrations (g. 100g⁻¹ DM) of Non Structural Carbohydrates (NSC) in branches (A, twigs Y, twigs Y-1, twigs <Y-1), trunk (B, High Trunk, Mid-h Trunk, Base Trunk) and roots (C, Main roots, Lateral roots, Fine roots) in drought (Dr) and control trees (Ct). Dead trees were also sampled in June and October 2016 when mortality was recorded. Starch concentrations are in dark grey and soluble sugar concentrations are in light grey. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between treatments for a given organ. Differences between starch concentrations are given in the lower line in lowercase letters whilst differences in soluble sugar concentrations are in the middle line in italics. Differences in NSC between treatments are given in the upper line in uppercase bold letters. $n=6$ each for Ct and Dr trees in October 2015 and June 2016 and $n=4$ in October 2016. Six dead trees (trees which presented no budburst in spring 2016) were sampled in June 2016 and four trees in October 2016 (trees which died suddenly during the growing season in 2016).

Figure VIII.6 Deviations (%) from control trees of NSC concentrations in drought and dead trees.

Figure VIII.7 Dry biomass (A, g) and nonstructural carbohydrate (b, NSC, g) and content in branches and trunks of drought (Dr) or control (Ct) trees. Dead trees were sampled in June and October 2016. Uppercase letters indicate differences between treatments for total NSC or biomass, middle lowercase letters indicate differences between values for branches, and lowercase letters at the bottom indicate differences for trunk values only. $n=6$ each for Ct and Dr trees in October 2015 and June 2016; $n=4$ in October 2016. Six dead trees (trees which presented no budburst) were sampled in June 2016 and four (trees which suddenly died during the growing season in 2016) in October 2016. Differences are significant at $p < 0.05$.

Figure IX.1 Evolution de la réserve en eau du sol durant toute l'expérimentation qui a débutée en Mai 2014 pour s'achever en Décembre 2016.

Figure IX.2 Photographie de l'expérimentation mettant en évidence les différents traitements et schématisation de l'entrée d'eau latérale (Crédit photo : C.Massonnet).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1 Classes, exemples et rôles fonctionnels de carbohydrates dans les plantes. Librement adapté et traduit de Hartmann et al. 2016.

Tableau IV.1 Caractéristiques du substrat en 2008 utilisé dans le dispositif en pleine terre. Analyse granulométrique, pH, rapport carbone/azote (C/N) et matière organique de la terre contenue dans les bâches du dispositif de plantation en pépinière. Une analyse est constituée de trois prélèvements par bêche (Da Silva, thèse, 2007).

Tableau IV.2 Effectifs des arbres abattus par traitement à chaque date.

Tableau IV.3 Tableau des effectifs des arbres abattus pour suivre la répartition ^{15}N arbre entier

Tableau IV.4 Tableau récapitulatif des expérimentations menées au cours de ce travail de thèse articulé sous 4 articles. Liste des abréviations utilisées : C pour Témoin, D pour Défeuillés, Dr. pour sous sécheresse, H. pour hiver, P. pour printemps, E pour été et A. pour automne.

Table VI.1. Concentrations of total nitrogen (N) and ^{15}N in mature leaves, N and ^{15}N in leaf proteins and N or ^{15}N portioning (the part of protein concentration in total N or ^{15}N concentration) in 9-year-old beech trees 4 days after ^{15}N labeling. Labeling experiments were conducted in spring and summer for the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate soil water deficit (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate a significant difference between treatments for a given date ($p < 0.05$). “Season effect” is indicated by an asterisk if a significant difference was found between spring and summer. Values are mean \pm SE, $n=6$ except for C and D trees in summer where 1 value is missing, then $n=5$. Statistical values (represented as F and P values) of the season and treatment effect or the interaction between season and treatment are given for each variable.

Table VI.2. Concentrations of nitrogen (N, % DM) in leaves and twigs divided by annual growth unit (Y, Y-1 and $<Y-1$, where Y is year) in 9-year-old beech trees 14 days after ^{15}N labeling. Labeling experiments were conducted in spring and in summer for the four treatments: control (C), defoliation (D), moderate soil water deficit (MD) and severe soil water deficit (SD). Different letters indicate a significant difference between treatments for a given date ($p < 0.05$). Asterisks in summer indicate a significant difference between seasons for a given treatment. Values are mean \pm SE; $n=12$. Statistical values (represented as F and P values) for season and treatment effect and their interactions are given for each compartment.

Table VI.3. Statistical values (F and P) for each variable given in Figure 3 ; biomass partitioning, nitrogen partitioning and ¹⁵N allocation for the effect of treatment, compartment (Cmpt) or the interactions between them (Treatment*Cmpt) in spring and summer.

Table VII.1 N concentration of green leaves (N green, %DM) in July 2015 and of marcescent leaves (N sen, %DM) in winter 2016 and the nitrogen resorption efficiency (NuR, %) in the four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C). n=12 for N green for all treatments in July; n=6 for N sen for C and D treatments; n=3 for MD and SD treatments.

Table VII.2. Seasonal changes of biomass, nitrogen and ¹⁵N amounts in aerial compartments of young beech trees (leaves, branches and trunk) in four treatments: moderate soil water deficit (MD), severe soil water deficit (SD), defoliation (D) and control (C) in February and June 2016. Different superscript letters indicate significant difference between treatments for a given date. A significant seasonal effect is indicated with stars (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$; ***; $p < 0.001$). Note that leaves correspond to marcescent leaves in February and to new leaves from spring growth in June.

Table V.1. Mean (\pm SE) concentration ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ DM) of main sugars (starch, sucrose, glucose, fructose, raffinose) on one-year-old branches on trees from soil water deficit (Dr.) or under defoliation (D) since the start of the experiment. C is for control treatment. We sampled dead trees in October 2015 and 2016 and in June 2016, n=8.

Résumé :

Les effets des changements climatiques sur les écosystèmes forestiers sont aujourd'hui mal connus et une augmentation des dépérissements forestiers a été observée ces dernières décennies. La question de savoir comment les arbres vont réagir face à ces changements brutaux est posée par la communauté scientifique mais pas encore résolue aujourd'hui. Plus précisément, les mécanismes écophysologiques sous-jacents à un phénomène de mortalité sont aujourd'hui mal connus. Néanmoins, la multiplicité des études a permis de dégager plusieurs hypothèses sur les mécanismes fonctionnels mis à l'œuvre lors d'un événement de dépérissement menant à la mortalité dont deux se dégagent : un dysfonctionnement du système hydraulique ou un épuisement des réserves carbonées. Néanmoins, ces hypothèses se sont révélées être non exclusives, ni exhaustives. D'autres hypothèses ont alors été proposées en complément à celles existantes. L'une d'entre elle porte sur la contribution d'un dysfonctionnement azoté lors de la mortalité d'un arbre. En effet, malgré son importance dans la physiologie de l'arbre et son grand investissement dans l'appareil photosynthétique, la disponibilité de l'azote dans le sol est faible ce qui pourrait être préjudiciable pour la survie. L'essence d'étude de ce travail de thèse est le hêtre commun (*Fagus Sylvatica* L.), très présent en Lorraine. De nombreuses observations font état d'un risque potentiel sur l'état écologique du hêtre face à ces changements climatiques globaux par notamment une baisse de la disponibilité en azote du sol et une augmentation des événements de sécheresse. Le travail au sein de cette thèse a donc cherché à évaluer la contribution des métabolismes azoté et carboné aux dysfonctionnements observés lors d'un épisode de dépérissement menant à une mortalité. Afin de mieux comprendre l'importance de ces deux métabolismes, il faut pouvoir modifier la disponibilité de ces deux composants essentiels que sont le carbone et l'azote. Nous avons choisi d'appliquer une défoliation et une sécheresse par un système d'exclusion de pluie dans une expérimentation semi-contrôlée. Une sécheresse modifiera la disponibilité de l'azote dans le sol et réduira l'assimilation carbonée via une fermeture stomatique en réponse à la baisse de la réserve en eau du sol. Une défoliation, quant à elle, par une perte de tissus photosynthétique, va impacter l'assimilation carbonée et mener à une perte d'azote massive étant donnée la forte concentration en azote dans le compartiment foliaire. Durant les 3 ans du projet, nous avons étudié comment le métabolisme azoté et carboné pouvaient être impactés par des défoliations annuelles successives ou une sécheresse longue et intense. Un suivi des réserves carbonées ainsi que des expériences de marquage isotopique (^{15}N) ont été réalisés. Notre étude a permis de montrer que face à une contrainte hydrique sévère ou une défoliation, le cycle azoté interne à l'arbre est conservé avec une forte allocation de l'azote vers le compartiment foliaire au printemps et un recyclage efficace de l'azote foliaire vers les organes pérennes à l'automne. Au moyen de marquage foliaire, nous avons pu estimer que cet azote recyclé à l'automne contribue fortement à la mise en place du nouveau compartiment foliaire au printemps suivant et ce, même face à des contraintes importantes. Nous avons pu également mettre en évidence que la quantité de réserves carbonées est maintenue face à une défoliation et, au moins dans un premier temps, face à une sécheresse. Néanmoins, la demande proportionnelle pour des besoins osmotiques a mené à des changements de la composition des sucres de jeunes branches et, face à une sécheresse longue et intense, à une baisse de la quantité de réserves carbonées jusqu'à la mort de l'arbre où les réserves carbonées sont fortement diminuées mais pas totalement épuisées. Finalement, le taux de mortalité dans notre expérimentation fut très faible indiquant la résistance du hêtre lorrain à des contraintes extrêmes que sont des défoliations successives ou une sécheresse longue et intense. Nos résultats soulignent le caractère de résistance du hêtre face à une contrainte via des ajustements des métabolismes internes mais cette résistance pourrait être perdue si la contrainte est plus longue et plus récurrente. Ces éléments peuvent questionner sur le possible maintien du hêtre face aux changements climatiques.

Abstract:

The effects of climate change on forest ecosystems are now poorly understood and an increase in forest dieback has been observed in recent decades. The question of how trees will react to these brutal changes is raised by the scientific community but not yet resolved. More precisely, the ecophysiological mechanisms underlying a mortality phenomenon are poorly known today. Nevertheless, the multiplicity of studies made it possible to draw several hypotheses on the functional mechanisms put into action during a death event leading to mortality, two of which emerge: a dysfunction of the hydraulic system or a depletion of carbon reserves. Nevertheless, these assumptions turned out to be neither exclusive nor exhaustive. Other hypotheses were then proposed in addition to existing ones. One of them relates to the contribution of nitrogen metabolism during a mortality event. Indeed, despite its importance in the physiology of the tree and its great investment in the photosynthetic apparatus, its availability in the soil is low which could be detrimental to the survival of the tree if this availability was to decrease. The model genus of this thesis is the common beech (*Fagus Sylvatica L.*), very present in Lorraine. Numerous observations point to a potential risk to the ecological status of beech in the face of these global climate changes, in particular a decrease in the availability of soil nitrogen and an increase in drought events.

The work in this thesis has therefore sought to evaluate the contribution of nitrogen and carbon metabolisms to dysfunctions observed during an episode of dieback leading to mortality. In order to better understand the importance of these two metabolisms, we must be able to modify the availability of these two essential components, carbon and nitrogen. We chose to apply defoliation or drought (not combined) through an experimental experiment on 8-year-old beech trees. A drought changes the availability of nitrogen in the soil and reduces carbon uptake via stomatal closure in response to decreasing soil water availability. Defoliation, by a loss of photosynthetic tissues, impacts the carbon assimilation and lead to a massive nitrogen loss due to the high concentration of nitrogen in the leaf compartment. During the 3 years of the project, we studied how the nitrogen and carbon metabolism could be impacted by successive annual defoliation or a long and intense drought (30 months).

Our study has shown that in the face of severe water stress or defoliation, the first lever of beech to cope with stress is a decrease in growth and leaf area. The internal tree nitrogen cycle is conserved with a strong allocation of nitrogen to the leaf compartment in the spring, its conservation in the foliage during the growing season and an efficient recycling of the leaf nitrogen to the perennial organs during nitrogen winter remobilization. Using foliar isotopic labeling, we have been able to estimate that this recycled nitrogen in the fall contributes significantly to the setting up of the new leaf compartment the following spring, even in the face of significant constraints. We have also been able to show that the quantity of carbon reserves is maintained in the face of defoliation and, at least initially, in the face of drought. Nevertheless, the proportional demand for osmotic requirements in the face of a long and intense drought has led to a decrease in the amount of carbon reserves. When the tree dies, the carbon reserves are greatly reduced, but not until exhaustion, contrary to the theory. Finally, the mortality rate in our experiment was quite low indicating the resistance of the Lorraine beech to extreme constraints such as successive defoliation or a long and intense drought. Our results emphasize the resistance character of the beech against a constraint via internal metabolism adjustments but this resistance could be lost if the stress is longer and more recurrent. These elements can question the possible maintenance of beech in the face of climate change.