



HAL
open science

Caractérisation des sources de graines françaises de *Cupressus dupreziana*, unique espèce végétale à reproduction apomictique mâle connue à ce jour

Jacques Francioly

► **To cite this version:**

Jacques Francioly. Caractérisation des sources de graines françaises de *Cupressus dupreziana*, unique espèce végétale à reproduction apomictique mâle connue à ce jour. Biodiversité et Ecologie. 2023. hal-04188762v2

HAL Id: hal-04188762

<https://hal.inrae.fr/hal-04188762v2>

Submitted on 6 Sep 2023

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.

Université de Perpignan Via Domitia



Master Biodiversité, Ecologie, Evolution

Parcours "Biodiversité et Développement Durable"

Partie 1

Caractérisation des sources de graines françaises de
Cupressus dupreziana, unique espèce végétale à
reproduction apomictique mâle connue à ce jour

Jacques Francioly



Année universitaire 2022-2023

Sous la direction de Christian Pichot

Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

UR 0629 « Écologie des Forêts Méditerranéennes »

INRAE

Financement de l'étude et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet REFER (Réseau Expérimental Forestier d'Essences de diversification pour le Renouvellement des forêts), MAA, convention n° E 11 / 2020. Il a impliqué la collaboration de la pépinière du Luberon pour l'élevage des plants (Lambesc), et celle de nombreuses personnes dévouées à qui je suis extrêmement reconnaissant.

Je tiens en premier lieu à remercier très sincèrement mon encadrant de stage, Christian Pichot, de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur le Cyprès du Tassili, une espèce exceptionnelle, du temps qu'il m'a accordé tout au long du stage, et d'avoir relu le texte de ce rapport avec une rigueur et une intelligence qui m'ont été d'une aide précieuse. Sa générosité, sa patience et son abnégation ont fait toute la différence. Je souhaite à tous les stagiaires de connaître une telle chance.

J'exprime toute ma gratitude à Didier Betored qui a dédié de nombreuses heures à ce projet pour rendre l'analyse des données possible, et à mesure qu'il prenait plus de temps que prévu, a fait preuve d'un dévouement et d'une patience admirables. Il a été assisté dans cette tâche par les précieux talents de Philippe Clastre, à qui j'exprime également toute ma gratitude.

Cathy Herfort m'a accompagné dans l'installation de l'expérimentation avec toute la persévérance et la minutie qu'une méthodologie scientifique peut exiger. Je lui adresse mes chaleureux remerciements pour les milliers de graines qu'elle m'a aidé à mettre en place et pour sa bonne humeur indéfectible.

Un grand merci à Marion Parizat, Aurore Gili, Frédéric Jean, Mehdi Pringarbe, William Brunetto et en particulier à Nasradin Touhami de m'avoir aidé à dénicher en un minimum de temps tout le matériel dont j'avais besoin pour mettre en œuvre le volet expérimental. Je tiens également à remercier Thomas Boivin pour son expertise entomologique et ses explications détaillées relatives à la contamination parasitaire apparue sur les graines.

Anne Roig a fait l'impossible pour que le génotypage de nos plantules soit prêt à temps, en prenant soin malgré tout de m'en présenter les différentes étapes et de partager avec moi ses connaissances en génétique. Je lui en suis sincèrement reconnaissant.

Enfin, j'adresse d'éternels remerciements à l'ensemble de l'équipe pour leur accueil chaleureux, pour l'atmosphère positive qu'ils entretiennent et pour leur enthousiasme à œuvrer en faveur des forêts méditerranéennes. Merci également aux nombreux collaborateurs externes à l'INRAe qui ont contribué à ce projet, Luc Picaut pour avoir pris soin de nos plantules avec autant d'intérêt, mais aussi Thierry Lamant, Didier Maerki, Michel Thinon ou encore Pierre Salomez pour tous les échanges qui ont abouti à l'actualisation de l'inventaire du Cyprès du Tassili en France.

Résumé

L'étude des caractères adaptatifs et génétiques des espèces en danger est une composante essentielle pour définir leur stratégie de conservation. Parmi les plus menacées, le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus), originaire des plateaux du Tassili N'Ajjer en Algérie, ne compte plus que 233 individus dans son aire naturelle. Son mode de reproduction apomictique mâle fonctionne selon le principe de mère porteuse et produit aussi en conditions ex-situ des embryons *C. sempervirens*. Notre étude porte sur la caractérisation des ressources françaises, pour leur faculté germinative et la proportion d'individus de chaque espèce. La détermination de l'espèce repose sur des critères morphologiques et, pour un sous échantillon, sur les marqueurs microsatellites. Le taux de germination moyen atteint 4,7% et 2/3 des plantules sont des *C. dupreziana*. Germination et proportion de *C. dupreziana* varient fortement selon la provenance et l'arbre mère. Le taux de germination est très corrélé avec la température du mois où opère la pollinisation, alors que la proportion de *C. dupreziana* s'expliquerait davantage par l'âge des arbres mères, les arbres âgés produisant davantage de pollen. La distinction entre les espèces reste difficile avant que les plantules aient atteint l'âge d'un mois.

Mots clés : Conservation, espèce menacée, diversité génétique, apomixie, potentiel adaptatif, germination, ressources génétiques

Table des matières

Financement de l'étude et remerciements.....	1
Résumé.....	2
Introduction.....	4
Matériels et Méthodes.....	6
Matériel végétal.....	6
Arbres échantillonnés.....	6
Graines et germination.....	6
Caractères mesurés.....	9
Taille des graines.....	9
Couleur des cotylédons.....	9
Détermination de l'espèce d'appartenance des plantules.....	9
Phénotypage.....	9
Génotypage.....	9
Caractérisation environnementale des sites.....	10
Météorologie.....	10
Distance à la mer.....	10
Analyses statistiques.....	10
Germination et proportion de <i>C. dupreziana</i>	10
Colorimétrie des cotylédons.....	11
Résultats.....	11
Germination des graines.....	11
Analyse de la germination au sein des plantules.....	12
Analyse de variance-covariance.....	12
Modèle linéaire généralisé:.....	14
Analyse du taux de <i>C. dupreziana</i> au sein des plantules.....	14
Analyse de covariance :.....	14
Modèle linéaire généralisé.....	15
Prédiction de la germination et du ratio d'espèces au sein des lots de graines.....	15
Discussion.....	18
Références Bibliographiques.....	20
Annexe 1.....	21
Inventaire national.....	21

Introduction

Le Cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus), également connu sous le nom de Cyprès de Duprez ou plus localement Tarout par les Touaregs (« Arbre de la soif » en tamahaq), constitue le seul conifère du Sahara. Il peut dépasser 20 m de hauteur et atteindre 12 m de circonférence dans son aire naturelle. L'espèce est strictement endémique des plateaux du Tassili N'Ajjer, en Algérie, où l'altitude oscille entre 1500 et 2000 mètres et la moyenne annuelle des précipitations n'excèdent pas 30 mm (Abdoun, 2002). La présence de conifères au beau milieu du désert est suspectée dès 1860, lorsque l'explorateur anglais H. B. Tristram suggère à son retour d'expédition qu'à « en juger par les boiseries des selles des Touaregs, il existe aussi une espèce de bois résineux dur probablement apparentée aux genévriers » (Tristram, 1860). Une observation qui plus tard s'avérera pertinente dans la mesure où les genres *Juniperus* et *Cupressus* sont phylogénétiquement voisins et tous deux inclus dans la famille des *Cupressaceae*.

Le dernier inventaire réalisé entre 1997 et 2001 par Fatiha Abdoun et Mohamed Beddiaf fait état de 233 arbres vivants dont une dizaine de jeunes individus, répartis inégalement sur une bande de 120 km de long et d'environ 6 km de large. Leur étude évoque de très nombreux vestiges de l'espèce (troncs, branches, ...), témoins d'une population autrefois bien supérieure aux 165 arbres morts recensés en 1972 (Grim, 1982). Le pollen du genre *Cupressus* découvert au cours d'analyses de sédiments indique une occupation de Cupressacées à plus de 1000 km des arbres encore en vie, de la Lybie voisine (Mercuri et al., 1998) au nord du Tchad (Quezel, 1978), au temps où les phases humides de l'Holocène (8000 à 4000 av. J.-C) formaient un biome beaucoup plus riche qu'aujourd'hui, communément appelé « Sahara vert ».

Alors que les plus vieux sujets vivants ont été estimés à plus de 2000 ans, le phénomène de désertification attribué à la région débute il y a seulement 500 ans et contraint probablement la population de cyprès à ne persister qu'en altitude, là où quelques cours d'eau saisonniers fournissent une source d'humidité supplémentaire par rapport à l'environnement extrêmement aride du reg¹ et des pentes rocheuses environnantes : « Son système racinaire s'insère profondément dans les anfractuosités de la roche dans lesquelles il peut puiser une humidité substantielle. » (Médail, 2019). Le manque de connaissances sur la physiologie de ce cyprès et sur les conditions climatiques auxquelles il est confronté ne permettent pas d'affirmer qu'il puisse subsister grâce aux brouillards et aux rosées fréquentes sur le plateau du Tassili (Dubief, 1999), néanmoins il est admis que la plupart des conifères sont en mesure d'absorber l'humidité atmosphérique par leur feuillage (Oren & Sheriff, 1995).

¹ Reg : désert pierreux

Son déclin, estimé à 8% sur une période de 30 ans (Abdoun & Beddiaf, 2002), a conduit l'UICN² à placer le cyprès du Tassili sur la liste rouge des espèces en danger critique d'extinction. La régénération naturelle de 2 à 3 arbres par siècle n'est pas suffisante pour maintenir la population sans une protection effective. En effet, les derniers représentants sont soumis à de nombreuses pressions essentiellement liées à l'émondage pastoral, mais aussi et surtout à la coupe de bois croissante destinée au bivouac des Touaregs, des migrants clandestins et des camps de touristes venus admirer les gravures rupestres de la région (Abdoun & Beddiaf, 2002; Chad & al., 2007). Le plan de sauvegarde de l'espèce établi en 2006 n'a malheureusement jamais pu aboutir, faute de stabilité politique (Médail, 2019).

La résistance extrême du Cyprès du Tassili à la sécheresse n'est pourtant pas la seule raison de plaider en sa faveur. Fait plus exceptionnel encore, une équipe de recherche menée par C. Pichot a dévoilé dans les années deux mille l'existence d'un mode de reproduction chez cette espèce jusque-là jamais observé chez les plantes (Pichot et al., 2001). D'ordinaire, la cellule reproductrice mâle des spermatophytes après la méiose ne présente qu'un seul jeu de chromosomes qui après fusion avec la cellule reproductrice femelle, haploïde elle aussi, permet à l'embryon de bénéficier d'un patrimoine génétique biparental. Or, en observant la taille inhabituelle des grains de pollen chez *Cupressus dupreziana* (38 microns, soit le plus gros de toutes les espèces de cyprès) et en les analysant par cytométrie en flux, les chercheurs ont découvert une production de gamètes non-réduits dans des proportions élevées (environ 75%). En retraçant l'origine de cette singularité génétique, une occurrence exceptionnelle d'anomalies méiotiques a pu être mise en lumière, qui chez cette espèce semblent être devenues la norme (El Maâtaoui & Pichot, 2001). Ces anomalies affectent la production de gamètes sains et seraient en mesure d'expliquer le très faible taux de germination de l'espèce (moins de 10% des graines étant normalement constituées). Dans certains cas, elles aboutissent néanmoins à la création d'un grain de pollen diploïde, qui après avoir pénétré dans l'ovule engendre un embryon d'origine exclusivement paternelle. Le gamétophyte femelle n'est voué ici qu'au développement de l'embryon et à son approvisionnement en éléments nutritifs. En d'autres termes, aucun gène n'est transmis par la voie femelle lors de la reproduction. Le cyprès du Tassili génère des clones du « père » dont l'embryon se développe grâce au principe de « mère porteuse ». La conséquence la plus surprenante de ce cas d'apomixie mâle est sans doute attribuable au fait que les ovules de *C. dupreziana* permettent le développement d'embryons d'origine paternelle à partir de pollen produit par une autre espèce, *Cupressus sempervirens* L. (Pichot & al., 2008). Ainsi, selon les espèces pollinisatrices qui l'entourent, une graine récoltée sur un cyprès du Tassili peut tout autant donner vie à une plantule de cyprès du Tassili diploïde qu'à un cyprès de Provence haploïde et parfois,

² UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

diploïde homozygote par doublement du jeu initial de chromosomes. Quelques cas de triploïdes interspécifiques ont aussi été détectés. Les essais de culture réalisés par l'INRAE entre les années 2000 et 2005 ont montré que sur 1169 cyprès issus de 4 collections ex-situ, la proportion de semences de *C. dupreziana* aboutissant à une plantule de la même espèce variait de 30 à 50%. Les autres se sont avérés être des cyprès de Provence le plus souvent homozygotes, exprimant régulièrement de fortes anomalies morphologiques (Nava, 2008). La variabilité du taux de graines pleines d'une part et la production d'embryons *C. dupreziana* versus *C. sempervirens* d'autre part restent à expliquer.

La présente étude poursuit la caractérisation du système reproductif du cyprès de Duprez, en spécifiant de manière plus approfondie les ressources mobilisables pour cette espèce. Dans cette perspective, une expérimentation a été mise en place afin d'étudier les lots de graines et de produire des plants à partir d'un nombre de provenances françaises élargi. Les deux objectifs sont d'analyser en fonction de l'origine du peuplement et de la mère porteuse i) la capacité germinative des graines produites et ii) la proportion d'embryons *C. dupreziana* ou *C. sempervirens*. Il s'agit également de déterminer le stade de développement des plantules à partir duquel la confusion, sur une base morphométrique, entre les deux espèces n'est plus possible. Ces travaux ont par ailleurs été l'occasion de reprendre les travaux menés par C. Laguerre en actualisant l'inventaire de l'espèce à l'échelle du territoire national (C. Laguerre, 2006).

Matériels et Méthodes

Matériel végétal

Arbres échantillonnés

Afin d'évaluer la variabilité des caractéristiques des graines selon l'origine, des semences ont été récoltées suivant un plan d'échantillonnage stratifié à 2 niveaux : sites et arbres mères au sein des sites. Les cônes ont été collectés du mois d'octobre 2022 à celui de février 2023 sur 55 arbres âgés de 14 à 58 ans, représentant 12 sites français, tous situés dans le sud-est de la France (Fig.1). Pour chacun de ces arbres, 20 cônes ont été évidés de leur graines avant d'être pesés et mesurés. Le stockage des semences a été effectué en chambre froide à une température de 5°C.

Graines et germination

Au total, environ 135 000 graines ont été recueillies par séchage des cônes avant d'être triées et pesées (poids total du lot, échantillonnage de 4*100 graines par lot, détermination du Poids pour 1000 graines), puis plongées dans un bain d'acide acétique dilué à 2% pendant 90 secondes (Fig. 2a). Ce traitement basé sur la littérature relative à l'aseptisation des semences (ITAB, 2013; Venail et al., 2017; Piyatida Inpitak et Udompijitkul, 2022) a été ajusté à la taille et à la perméabilité des graines de *C. dupreziana*.

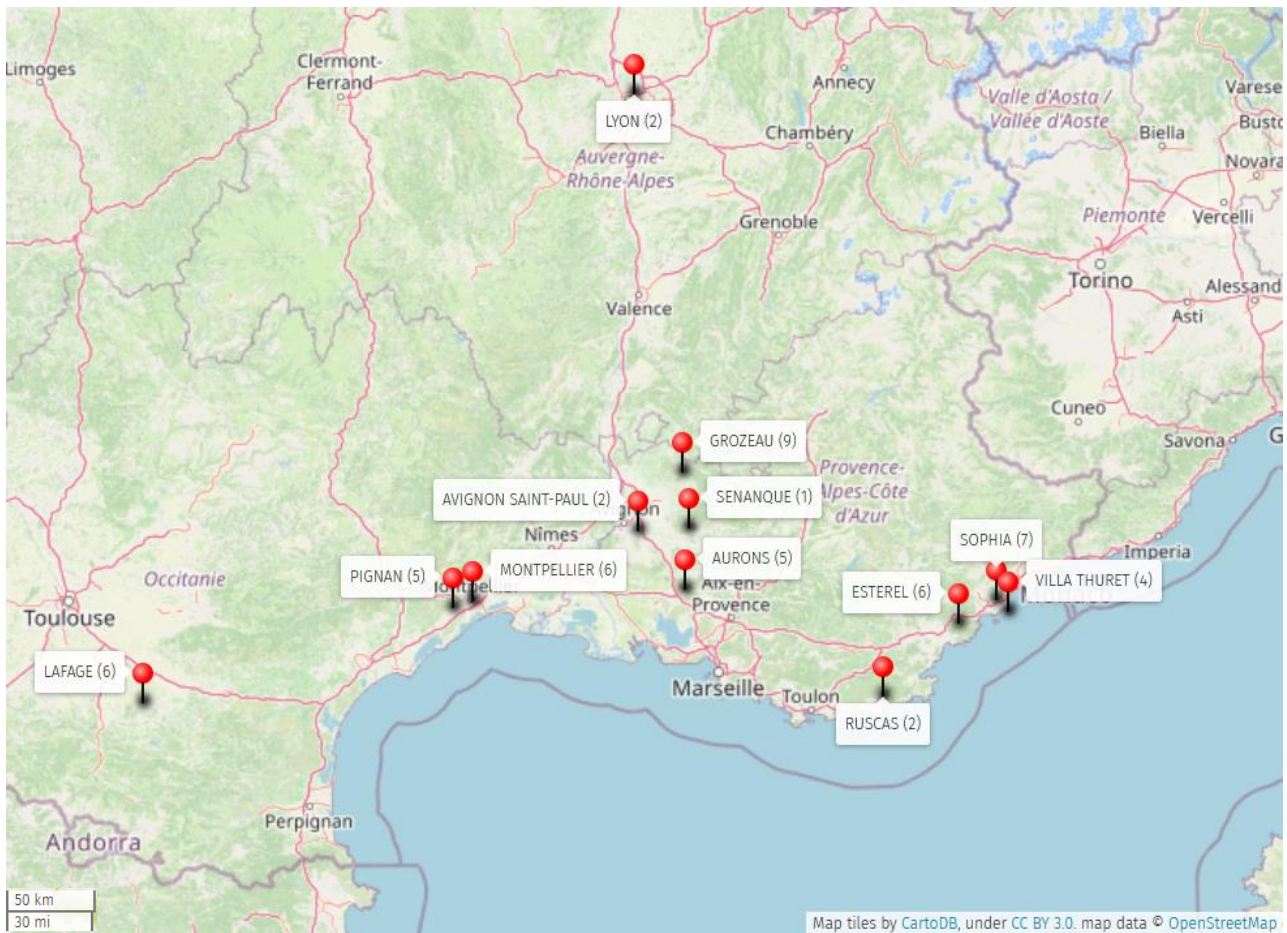


Fig. 1 Sites des arbres échantillonnés (Nombre de cyprès échantillonnés)

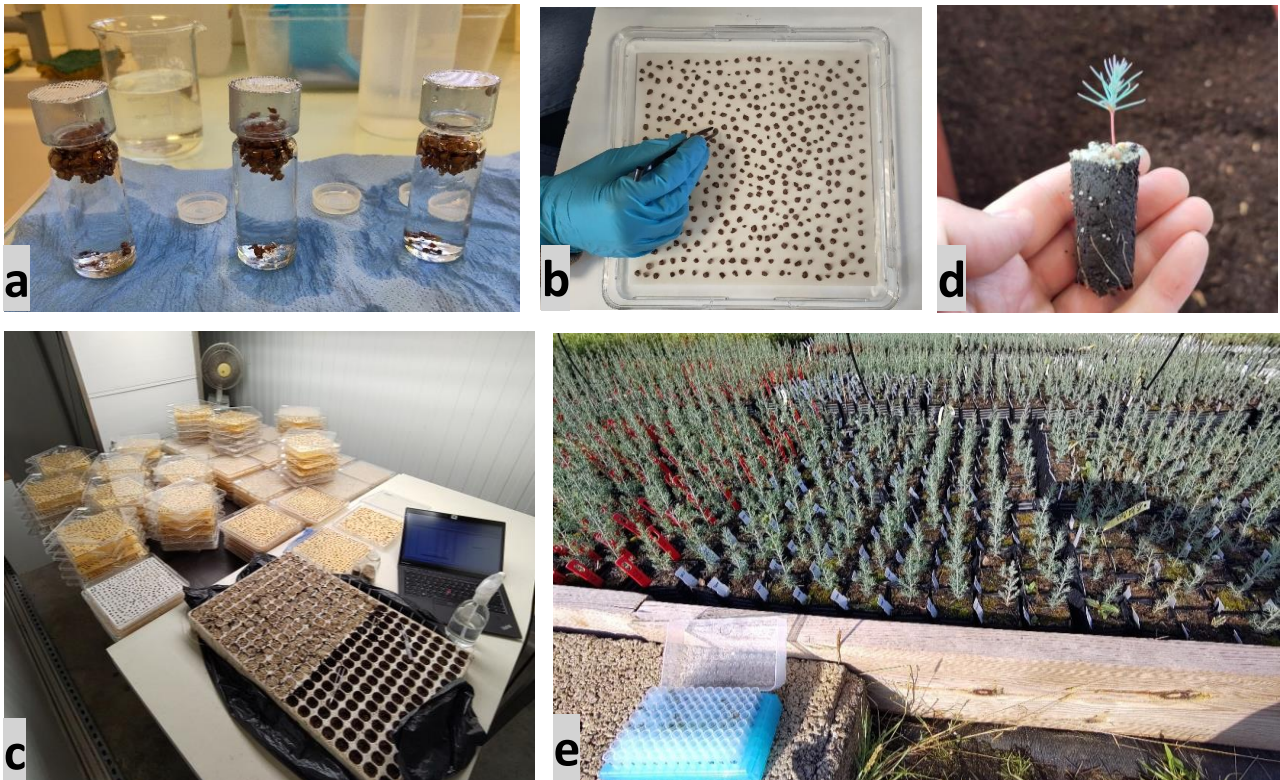


Fig. 2a-e Principales étapes du protocole expérimental **a** Aseptisation des graines. **b** Installation des graines en boîtes de Pétri. **c** Semis des graines germées en terre. **d** Repiquage en contenants de 600cm³. **e** Elevage des plantules en pépinière et prélèvement de matériel pour génotypage.

Le test de germination a été scindé en deux séries, du 17 février au 13 mai 2023 pour la première et du 14 avril au 14 juin 2023 pour la seconde. Dans chacune des séries, les graines issues d'une même « mère » ont été réparties dans 3 boîtes de Pétri de 25cm², constituant ainsi 3 répétitions. Les boîtes ont été préalablement nettoyées puis plongées pendant 1 heure dans une solution diluée au 1/10^e à partir d'eau de javel chlorée à 2,6%. Dans chacune des boîtes a été disposée une feuille de papier buvard stérilisée par chaleur humide sous pression (autoclave), sur laquelle une quantité de graines prédéfinie a été répartie de manière homogène (Fig. 2b). Les pinces souples, piluliers et béciers ont été régulièrement désinfectés par chaleur sèche pendant une heure à 140°C et des gants stériles ont été utilisés tout au long de la manipulation des semences.

Parmi les 55 lots que comprend cette expérimentation, 10 d'entre eux ont présenté sur leurs graines des trous d'environ 1mm de diamètre nettement découpés, évoquant la possibilité d'une présence de larves d'insectes dans les graines.

Les 6 boîtes de Pétri renfermant les graines d'un arbre mère ont été installées dans différents lieux : deux chambres climatiques contrôlées (Fig. 2c) (taux d'humidité moyen : 70,3% ; T° moy : 20,6°C ; T° min : 10,4°C ; T° max : 25,5°C ; éclairage par LED 12h/jour) et un laboratoire (taux d'humidité moyen : 52,8% ; T° moy : 18°C ; T° min : 13,5°C ; T° max : 25,3°C ; luminosité naturelle). Humidité et température ont été enregistrées par HOBO Pro V2 à une fréquence de 5min. Les papiers buvard ont été maintenues humides pendant toute la durée de l'expérimentation par apport d'eau distillée à l'aide d'un flacon pulvérisateur. Afin de caractériser les semences en termes de taille et de quantité, les 343 boîtes de Pétri ont été photographiées avant la germination selon un protocole standardisé. Les boîtes ont été placées sous un caisson de plexiglas entouré d'une bande LED pour un éclairage uniforme des graines. Les photos ont été prises avec un smartphone Fairphone 4 équipé d'un capteur 48MP, positionné en haut du caisson en plexiglas et conduisant à une résolution de 14µm.

Le suivi régulier des germinations a permis une évaluation précise de la date de sortie de la racine, avec une résolution journalière. Chaque graine germée s'est vue attribuer un numéro unique, assurant ainsi la traçabilité des plantules tout au long de l'expérience. Les graines germées ont été transférées dans des plaques de germination comprenant 285 puits et les plantules ont été élevées en chambre de cultures pendant environ 2 semaines avant transfert à la pépinière Naudet à Lambesc (13). Les plantules ont ensuite été élevées sous serre pendant environ 4 semaines puis repiquées au moment approprié (Fig. 2d) en conteneur de 600cm³ et enfin acclimatées aux conditions extérieures.

Caractères mesurés

Taille des graines

Les photographies des boîtes de Pétri ont été analysées à l'aide de scripts exécutés par les logiciels GRASS et QGIS, scripts permettant un détournage précis des graines et un enregistrement automatique de la géométrie et de la surface de chaque graine dans une base de données PostgreSQL.

Couleur des cotylédons

Considérant l'aspect plus bleuté du feuillage chez les individus adultes de *C. dupreziana*, une analyse colorimétrique des cotylédons a été mise en place afin d'évaluer si les variations pigmentaires observées chez les semis permettaient d'en déduire l'espèce. À cette fin, 8 plaques de germination de 285 puits ont été photographiées tous les 3 jours pendant 6 à 15 jours. Les images ont pu être capturées à l'aide d'un appareil photo Canon EOS 450D 12MP monté sur trépied. Les prises de vue des plantules ont été réalisées dans une chambre noire où aucune lumière extérieure n'a pu altérer leur teinte, et en utilisant le flash de l'appareil pour assurer une exposition uniforme à chaque cliché (V :1/80, f :5.6). L'analyse colorimétrique et le traitement des images a été réalisée à l'aide des logiciels PostgreSQL, GRASS et QGIS.

Détermination de l'espèce d'appartenance des plantules

Phénotypage

Nous avons procédé à l'observation des caractères morphologiques des plantules après que celles-ci aient toutes atteint un âge supérieur à 40 jours. L'identification a principalement porté sur la phyllotaxie, la croissance de la plantule ainsi que la longueur et la forme des feuilles. Une seconde personne, spécialiste de *Cupressus dupreziana*, a pris part à cet exercice sur la moitié des plants produits afin d'atténuer le biais lié à l'opérateur. Cette approche collaborative nous a permis d'assurer une validation croisée des observations à hauteur de 98%.

Génotypage

Les observations phénotypiques ont été renforcées par une approche d'échantillonnage dédiée au génotypage sur environ 10% des plantules produites. Un prélèvement semi-aléatoire de feuilles a été effectué dans l'ensemble de la production (Fig. 2e) sur 100 plantules identifiées comme *C. dupreziana*, 100 plantules identifiées comme *C. sempervirens* et 154 plantules pour lesquelles l'identification visuelle restait incertaine. Nos analyses génétiques ont donc porté sur 354 individus auxquels 23 témoins ont été ajoutés. Pour cette étude, l'ADN des échantillons a pu être extrait des feuilles (50 mg) à l'aide des kits pour plantes QIAGEN DNeasy 96, avant d'être amplifié par PCR. Le génotypage a été réalisé dans un séquenceur capillaire HITACHI 3730xl DNA Analyzer à l'aide de marqueurs microsatellites développés pour *C. sempervirens* par Sebastiani et al. (2005) et déjà

utilisés par l'INRAe pour des plantules provenant de mères *C. dupreziana* (Nava et al., 2009) : CYP 174 (800nm), CYP 257 et CYP 258 (700nm), CYP 293 (800nm).

Caractérisation environnementale des sites

Météorologie

Les arbres échantillonnés se développent de 27m (Montpellier, Hérault) à 410m (Ruscas, Var) d'altitude, et certains d'entre eux sont distants de plus de 400km. De ce fait, il semblait pertinent d'intégrer les conditions climatiques de chaque site dans notre analyse, en ciblant plus particulièrement celles associées à la période de pollinisation des cônes récoltés (janvier-février 2021). Nous avons pour cela exploité les données mensuelles de températures et de pluviométrie disponibles sur le site internet meteociel.fr, provenant des stations météorologiques les plus proches des sites étudiés (distance moyenne : 16,7km ; distance maximum : 40km).

Distance à la mer

Pour compléter notre analyse, nous avons également inclus dans notre modèle la distance séparant les arbres mère de la mer Méditerranée. Ce facteur est destiné à capturer les effets de l'humidité atmosphérique, des masses d'air marines ou encore de microclimats locaux. Ces données ont été estimées à l'aide du site internet uMap.

Analyses statistiques

Germination et proportion de *C. dupreziana*

Nous avons fait le choix de retirer de notre étude les données issues des 3 descendances maternelles : THURET J2007 pour la nature incertaine de l'espèce de l'arbre mère et ses résultats de germination anormalement élevés, GROZEAU 48/303 pour la faible quantité de graines initiale et l'absence totale de germination ainsi que LAFAGE 1, pour lequel les semences proviennent de cônes pollinisés une année avant les autres (2020 et non pas 2021).

L'ensemble des analyses a été effectué à l'aide du logiciel statistique Rstudio. Les taux de germination et les proportions de *C. dupreziana*, exprimés sous forme de données binomiales, ont été analysés à l'aide d'une régression linéaire généralisée (GLM) avec pour fonction de lien logit ($\log(p/(1-p))$), et construits selon le plan suivant :

```
glm(cbind(germination$Nbgermees,germination$Nbnongermees)~dateplantation+tmax01+distmer+serie+labo%in%serie+Prov+Mere%in%Prov, data=germination, family=binomial).
```

Nous avons évalué les effets des facteurs (site de provenance, mère, série, lieu de culture) et des variables (taille des graines, vitesse de germination, distance à la mer, âge des mères, températures et précipitations) à l'aide d'analyses de déviance (fonction ANOVA avec test du chi-carré sur le modèle GLM).

Pour améliorer l'adéquation à une distribution plus normale, nous avons analysé la racine carrée du taux de germination, qui est plus conforme à l'hypothèse de normalité requise pour les analyses statistiques.

Colorimétrie des cotylédons

Nous avons entraîné un modèle à prédire l'espèce en fonction de la couleur de ses cotylédons. Une phase de prétraitement a permis de normaliser nos données en tenant compte du niveau d'intensité du rouge et du vert ainsi que des proportions entre le rouge, le vert et le bleu (RVB). Puis, la distribution des valeurs indiquant le pouvoir discriminant du modèle a été estimée par bootstrap (1000 répétitions avec 70% des données pour la calibration du modèle et 30% pour la validation du modèle). Pour chaque tirage, le modèle d'analyse discriminante linéaire a été utilisé sous la forme : $lda(espece \sim green + red + BGratio + BRratio + RGratio, data = train)$.

Résultats

Germination des graines

L'aseptisation des graines et le maintien d'un environnement aussi stérile que possible ont été très efficaces malgré l'apparition de mycéliums en fin de processus (sans impact sur la germination). Quelques larves de *Cecidomyiidae*, probablement le genre *Contarinia* qui se développe sur des cyprès

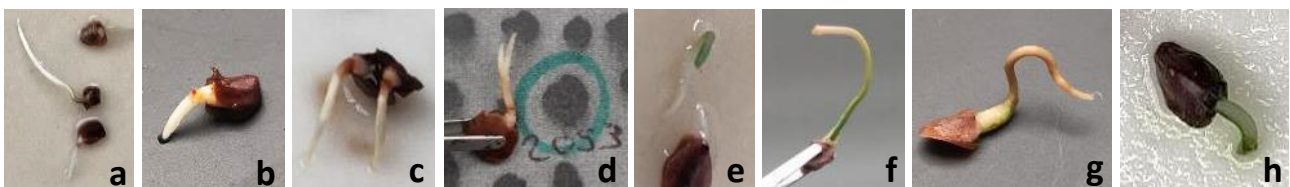


Fig. 3a-h Observation des différents types de germination. **a-b** Radicules de référence. **c-d** Graines contenant deux embryons. **e-h** Anomalies diverses constatées lors de la phase germinative.

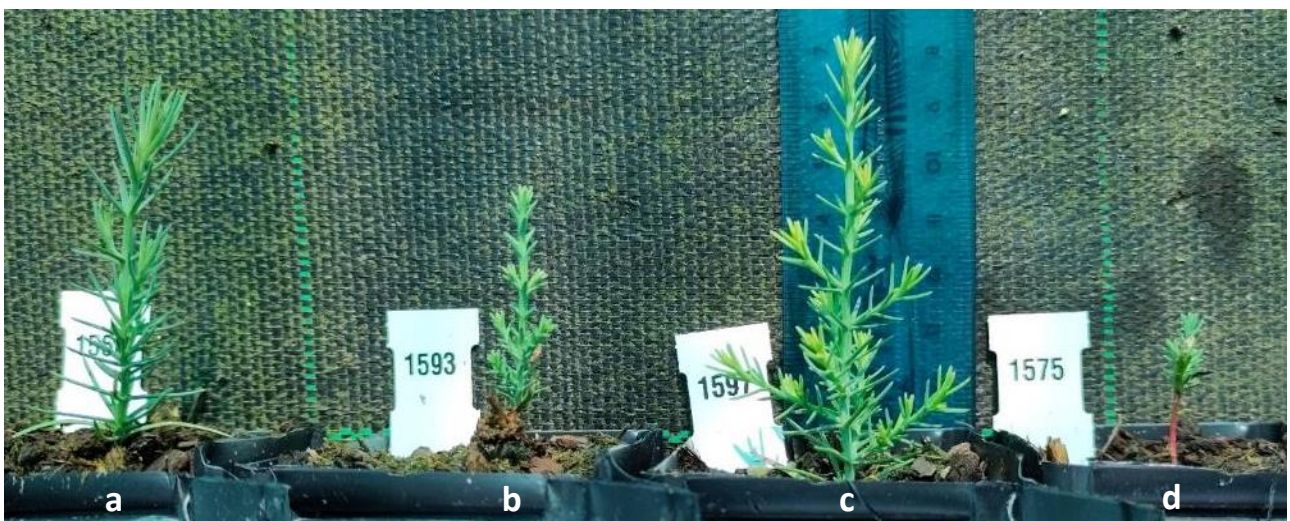


Fig. 4a-d Phénotypes de plantules provenant de graines de *C. dupreziana*, germées le même jour. **a** Plantule de *C. dupreziana*. **b-d** Plantules de *C. sempervirens*.

du sud-est de la France (Boivin & Auger-Rozenberg, 2016), ont été observées sur environ 10 graines en provenance de la région d'Antibes. Par ailleurs, dès les premiers jours, nous avons relevé qu'environ 0,5% des graines germées contenait un embryon double (Fig. 3c-d), dont la disparition naturelle de l'une des deux radicules à plus ou moins court terme a systématiquement laissé place à un seul individu. Nous avons également pu remarquer sur plusieurs radicules un aspect anormal (forme, couleur, apex tronqué), souvent associé à une vitesse de croissance ralentie (Fig.3 e-h). Aucune d'entre elles n'ayant survécu, l'analyse génétique de ces plantules n'a pu être entreprise. Néanmoins, les travaux de L. Nava ont montré que les embryons de *C. sempervirens* issus d'ovules de *C. dupreziana* pouvaient donner lieu à de fortes anomalies morphologiques, héritées de « tares génétiques présentes naturellement chez *C. sempervirens* et ici révélées en raison de l'état haploïde ou diploïde probablement homozygote » (Nava, 2008). Cette dépression de consanguinité, dont nous avons pu constater les effets sur une grande partie des plantules de *C. sempervirens* de notre production (Fig.4 b-d), pourrait expliquer les aberrations phénotypiques de certaines radicules ainsi que le fort taux de mortalité juvénile de notre production (25,9% de la production, soit 1267 individus dont 1197 morts avant repiquage à 6 semaines).

Analyse de la germination au sein des plantules

Le taux de germination global a été de 4.68% (4890 germinations parmi les 104561 graines mises en culture), variant de 0,38% à 10,99% entre mères).

Les données climatiques enregistrées pendant la période de pollinisation se sont avérées étroitement liées entre elles, ce qui a pour effet de rendre leur signification indépendante insuffisante. Nous avons simplifié cet ensemble en utilisant la moyenne des températures maximales de janvier 2021, cette variable s'avérant la plus représentative d'entre elles (Fig.5a). Le graphique d'analyse en composantes principales (Fig. 5b) nous permet d'observer la répartition des sites échantillonnés en fonction des conditions météorologiques de la pollinisation (Tmax01), de la distance des sites par rapport à la mer (DistMer), mais aussi de l'année de plantation des mères (DatePlantation). On y retrouve notamment les deux plantations d'âges différents sur le site du Grozeau (GROZEA), représentées par la formation de clusters bien distincts.

Analyse de variance-covariance

Les résultats (Tableau 1) montrent un fort impact des facteurs Mères et Provenance, ainsi qu'une corrélation significative avec la température maximale en période de pollinisation et la distance des sites à la mer. Toutefois, en inversant l'ordre des variables "tmax01" et "distmer", "distmer" perd sa significativité (Tableau 1a,c), ce qui suggère que malgré la forte corrélation entre les deux variables, les conditions climatiques lors de la pollinisation (tmax01) ont une répercussion plus importante sur la germination que la simple distance à la mer. Nous notons par ailleurs l'influence limitée de l'âge

des mères (dateplantation) et l'absence d'effet du lieu de culture (labo). L'influence significative de la série contraste avec celui du lieu de culture, et pourrait être rattaché à un mode d'arrosage des graines et à des cycles de températures légèrement différents.

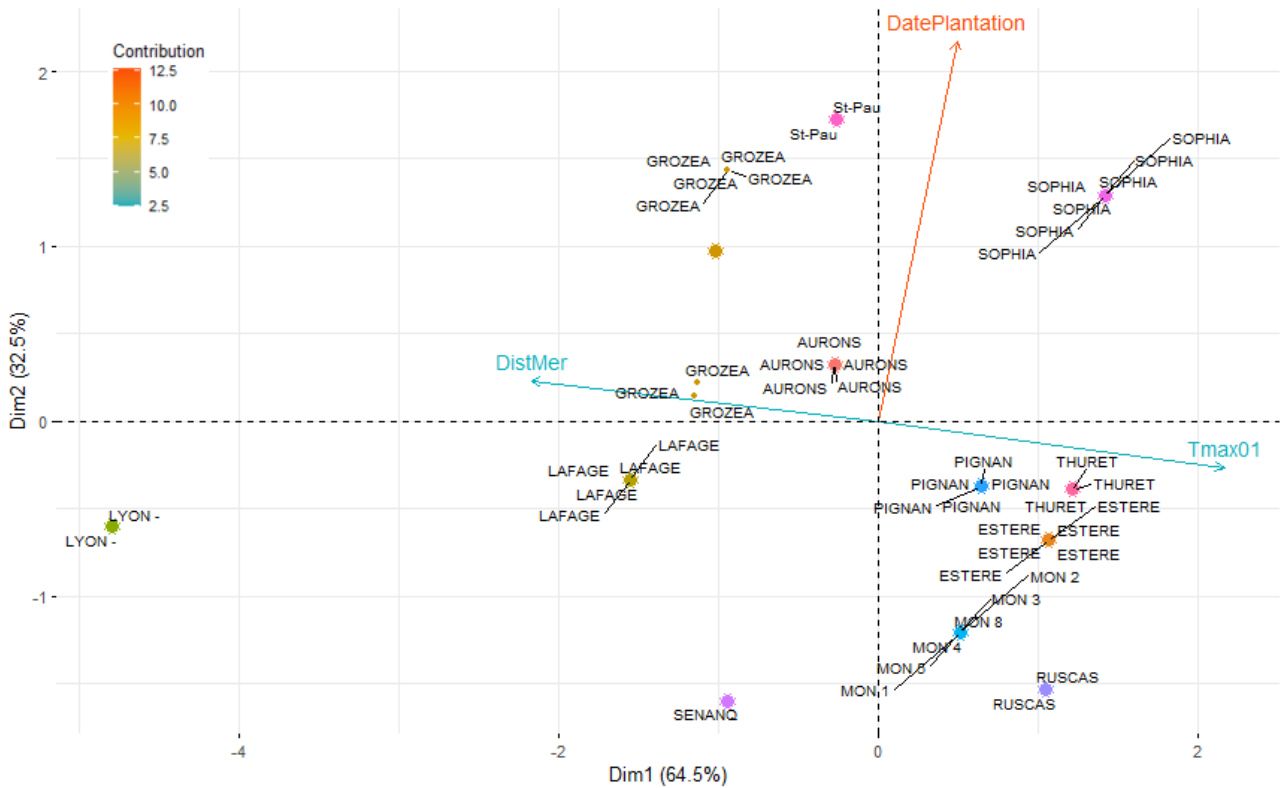


Fig.5 a-b Analyse des covariables

a Par corrélation de Pearson **b** Par projection (ACP)

Avec : **P01** : Précipitations de janvier 2021, **P02** : Précipitations de février 2021, **Tmax01** : Moyenne des T°C maximum de janvier 2021, **Tmax02** : Moyenne des T°C maximum de février 2021, **Tmin01** : Moyenne des T°C minimum de janvier 2021, **Tmin02** : Moyenne des T°C minimum de février 2021, **Tminabs01** : T°C minimum absolue de janvier 2021, **Tminabs02** : T°C minimum absolue de février 2021, **DistMer** : Distance à la mer, **DatePlantation** : Date de plantation des arbres mères

a

Tableau 1a-c Résultats de l'analyse de variance de l'effet des variables et facteurs sur la germination selon leur séquence d'intégration dans le modèle (**a b c**).

a	Df	F value	Pr(>F)	b	Df	F value	Pr(>F)	c	Df	F value	Pr(>F)
dateplantation	1	0.290	0.590578	tmax01	1	211.905	< 2e-16 ***	dateplantation	1	0.290	0.590578
distmer	1	175.412	< 2e-16 ***	distmer	1	0.427	0.513971	tmax01	1	217.653	< 2e-16 ***
tmax01	1	42.368	4.43e-10 ***	dateplantation	1	5.738	0.017372 *	distmer	1	0.127	0.722253
serie	1	12.024	0.000623 ***	serie	1	12.024	0.000623 ***	serie	1	12.024	0.000623 ***
Prov	8	36.250	< 2e-16 ***	Prov	8	36.250	< 2e-16 ***	Prov	8	36.250	< 2e-16 ***
serie:labo	4	0.402	0.807042	serie:labo	4	0.402	0.807042	serie:labo	4	0.402	0.807042
Prov:Mere	34	4.618	7.30e-13 ***	Prov:Mere	34	4.618	7.3e-13 ***	Prov:Mere	34	4.618	7.3e-13 ***
Residuals	238			Residuals	238			Residuals	238		

Modèle linéaire généralisé:

En appliquant l'analyse de déviance sur un modèle GLM binomial (Graines germées - graines non germées), nous constatons des résultats globalement similaires à notre précédente analyse de données (Tableau 2). En revanche, l'effet de l'âge des mères sur la germination devient très significatif après que tmax01 et distmer aient pleinement exprimé leur part dans la variabilité. La variable « distmer » reste significative quelle que soit sa position vis-à-vis de « tmax01 », bien que cette dernière conserve un effet plus fort sur la germination en étant placée avant « distmer » dans le modèle (Tableau 2a,c). Nous pouvons par ailleurs mentionner la p-value associée au lieu de culture (labo), qui acquiert ici une signification statistique malgré sa faible valeur.

Analyse du taux de *C. dupreziana* au sein des plantules

En raison de la perte d'identité de certains semis, l'ensemble des données à été réduit à 4631 individus. Sur la base des travaux de Nava, les individus morts ont été attribués à l'espèce *C. sempervirens*.

Analyse de covariance :

Tableau 2a-c Résultats de l'analyse statistique basée sur le modèle linéaire généralisé évaluant l'influence des variables et facteurs sur le processus de germination selon leur séquence d'intégration dans le modèle (**a b c**).

a	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)	b	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)	c	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)
NULL			2282.13		NULL			2282.13		NULL			2282.13	
dateplantation	1	0.92	2281.21	0.337735	tmax01	1	655.70	1626.43	< 2.2e-16 ***	dateplantation	1	0.92	2281.21	0.337735
distmer	1	720.54	1560.67	< 2.2e-16 ***	distmer	1	57.88	1568.54	2.780e-14 ***	tmax01	1	677.44	1603.77	< 2.2e-16 ***
tmax01	1	12.90	1547.76	0.000328 ***	dateplantation	1	20.78	1547.76	5.156e-06 ***	distmer	1	56.01	1547.76	7.223e-14 ***
serie	1	19.61	1528.15	9.494e-06 ***	serie	1	19.61	1528.15	9.494e-06 ***	serie	1	19.61	1528.15	9.494e-06 ***
Prov	8	683.82	844.33	< 2.2e-16 ***	Prov	8	683.82	844.33	< 2.2e-16 ***	Prov	8	683.82	844.33	< 2.2e-16 ***
serie:labo	4	8.28	836.05	0.081767 .	serie:labo	4	8.28	836.05	0.08177 .	serie:labo	4	8.28	836.05	0.08177 .
Prov:Mere	34	343.28	492.77	< 2.2e-16 ***	Prov:Mere	34	343.28	492.77	< 2.2e-16 ***	Prov:Mere	34	343.28	492.77	< 2.2e-16 ***

Avec la méthodologie utilisée pour le taux de germination, nous avons testé l'impact individuel des covariables sur le taux de *C. dupreziana* en modifiant leur ordre d'intégration dans le modèle. Les résultats (Tableau 3) montrent un effet très fort de l'âge des mères et une influence significative de la température pendant la pollinisation (tmax01), variable très corrélée avec la distance à la mer. Cependant cette dernière (distmer) a moins d'impact sur la proportion de *C. dupreziana* que Tmax01, probablement en raison de sa moindre considération de l'espèce par rapport à la variable Tmax01.

Tableau 3a-c Résultats de l'analyse de variance de l'effet des variables et facteurs sur le taux de *C. dupreziana* selon leur séquence d'intégration dans le modèle (**a b c**).

a	Df	F value	Pr(>F)	b	Df	F value	Pr(>F)	c	Df	F value	Pr(>F)
dateplantation	1	41.381	7.33e-10 ***	tmax01	1	27.912	2.97e-07 ***	dateplantation	1	41.381	7.33e-10 ***
distmer	1	30.928	7.50e-08 ***	distmer	1	4.700	0.0312 *	tmax01	1	43.727	2.67e-10 ***
tmax01	1	13.928	0.00024 ***	dateplantation	1	53.625	4.19e-12 ***	distmer	1	1.128	0.289
serie	1	0.755	0.38581	serie	1	0.755	0.3858	serie	1	0.755	0.386
Prov	8	13.270	1.08e-15 ***	Prov	8	13.270	1.08e-15 ***	Prov	8	13.270	1.08e-15 ***
serie:labo	4	0.722	0.57767	serie:labo	4	0.722	0.5777	serie:labo	4	0.722	0.578
Prov:Mere	34	3.530	7.69e-09 ***	Prov:Mere	34	3.530	7.69e-09 ***	Prov:Mere	34	3.530	7.69e-09 ***
Residuals	227			Residuals	227			Residuals	227		

Modèle linéaire généralisé

Comme attendu, les résultats obtenus avec le GLM (Tableau 4) ne changent pas fondamentalement les conclusions obtenues avec l'ANOVA. La date de plantation et la température lors de la pollinisation restent les variables qui influent le plus le taux de *C. dupreziana*, et l'on retrouve une forte corrélation entre tmax01 et distmer. Nous observons que l'influence de l'effet de série prend une ampleur considérable, que nous attribuons à la complexité accrue de l'identification des plantules de la série 2 en raison de leur jeunesse, et au fait que cette identification a été effectuée par un seul observateur.

Tableau 4a-c Résultats de l'analyse statistique basée sur le modèle linéaire généralisé évaluant l'influence des variables et facteurs sur le taux de *C. dupreziana* selon leur séquence d'intégration dans le modèle (**a b c**).

a	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)	b	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)	c	Df	Dev.Res.	Dev	Pr(>Chi)
NULL			855.14		NULL	277		855.14		NULL			855.14	
dateplantation	1	62.353	792.79	2.871e-15 ***	tmax01	1	276	838.86	5.468e-05 ***	dateplantation	1	62.353	792.79	2.871e-15 ***
distmer	1	38.750	754.04	4.817e-10 ***	distmer	1	275	838.52	0.5589	tmax01	1	46.929	745.86	7.361e-12 ***
tmax01	1	8.296	745.74	0.003973 **	dateplantation	1	274	745.74	< 2.2e-16 ***	distmer	1	0.118	745.74	0.7315
serie	1	32.175	713.56	1.409e-08 ***	serie	1	273	713.56	1.409e-08 ***	serie	1	32.175	713.56	1.409e-08 ***
Prov	8	267.164	446.40	< 2.2e-16 ***	Prov	8	265	446.40	< 2.2e-16 ***	Prov	8	267.164	446.40	< 2.2e-16 ***
serie:labo	4	5.658	440.74	0.226165	serie:labo	4	261	440.74	0.2262	serie:labo	4	5.658	440.74	0.2262
Prov:Mere	34	150.996	289.75	< 2.2e-16 ***	Prov:Mere	34	227	289.75	< 2.2e-16 ***	Prov:Mere	34	150.996	289.75	< 2.2e-16 ***

Prédiction de la germination et du ratio d'espèces au sein des lots de graines

Le modèle linéaire généralisé est non seulement mieux adapté aux données non-normées et aux différentes tailles d'échantillons que l'analyse de variance, mais sous sa forme binaire (graines germées – graines non germées ; *C. dupreziana* – *C. sempervirens*) il permet également des prédictions plus précises des valeurs estimées, en utilisant une fonction de lien pour relier les variables indépendantes à la probabilité de succès (graine germée ou *C. dupreziana*). Des intervalles de confiance fiables des taux de germination et des proportions de *C. dupreziana* ont été évalués dans l'espace d'estimation du modèle binomial, avant d'être reprojétés dans l'espace initial par la fonction

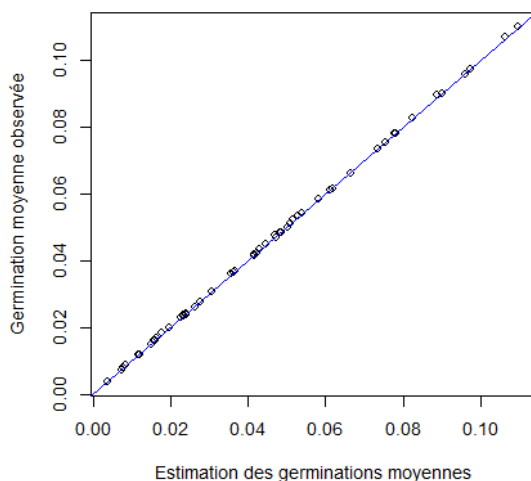


Fig.6 Comparaison entre les taux de germination observés et estimés

inverse ($\exp(x)/(1+\exp(x))$). Les valeurs attendues sont extrêmement proches des valeurs observées, notamment pour les germinations (Fig. 6).

Les estimations montrent la nette ségrégation des taux de germination attribuable aux arbres mères et à leur provenance (Fig. 8). Le contraste est particulièrement visible : d'une part au niveau du site « Grozeau » (limite nord du Vaucluse), où les taux de germination sont modérés mais stables et relativement uniformes, et d'autre

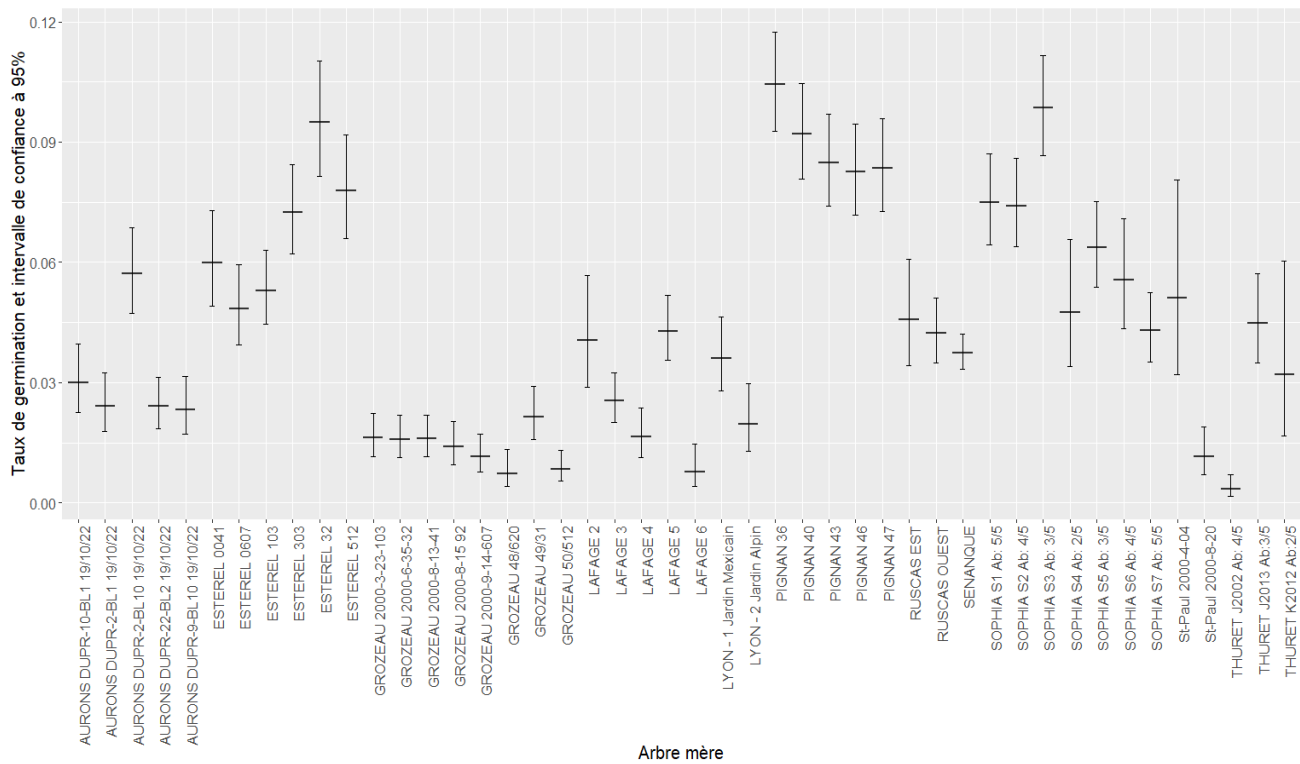


Fig. 8 Estimation des taux de germination par « Mère » avec intervalles de confiance à 95%

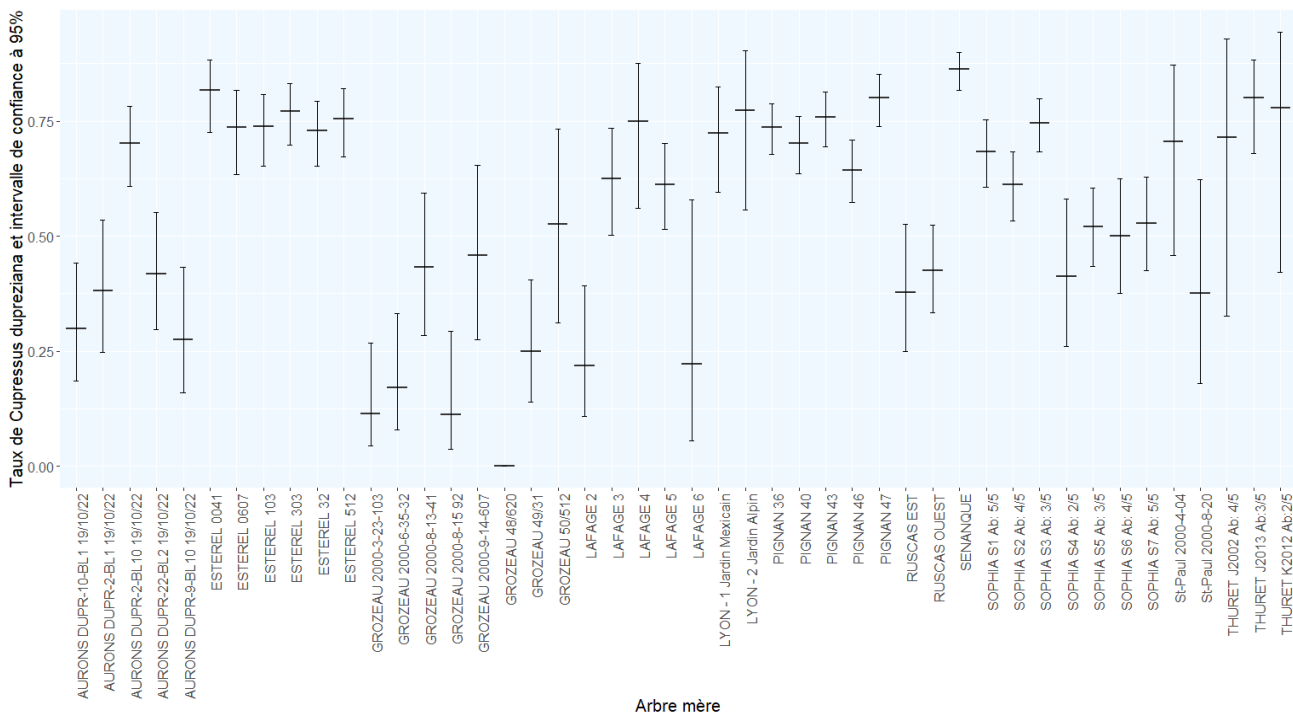


Fig. 9 Estimation des taux de *C. dupreziana* produits par « Mère » avec intervalles de confiance à 95%

part au site « Pignan » (sud-est de Montpellier), où malgré un effet « mère » plus prononcé, le taux de germination global est le plus élevé (9,4%). En ce qui a trait à la proportion de *C. dupreziana*, les clusters des sites sont moins marqués pour la germination mais néanmoins très distincts (Fig. 9). Les mères échantillonnées dans le massif de l'Estérel et à Pignan présentent de loin la plus faible

variabilité, mais aussi les plus fortes proportions globales de *C. dupreziana*, avec respectivement des taux moyens de 76,2% (de 71,9% à 80,8%) et 72,8% (de 64,7% à 79,5%). Le site de la Villa Thuret (3 arbres mères) se rapproche de ces valeurs (71,9%). Il est toutefois intéressant de noter que ces 3 sites se situent à moins de 10 km de la mer, et bénéficient par là-même d'un climat particulier. Par ailleurs les arbres qu'ils abritent comptent parmi les plus vieux (Esterel : 42 ans, Pignan : 39 ans VT : 38 ans). L'effet de l'âge est particulièrement notable à Sénanque, où la mère la plus âgée (58 ans) produit la plus forte proportion de *C. dupreziana* (86%). À l'inverse, la seule mère à n'avoir engendrer que des plantules de *C. sempervirens* se trouve sur le site du Grozeau (âge : 36 ans, distance à la mer : 100 km), bien que pour cette dernière les résultats soient peu représentatifs (seulement 4 graines germées). Globalement, les graphiques des figures 8 et 9 indiquent une corrélation positive entre les taux de germination et *C. dupreziana*, ce qu'a pu confirmer un coefficient de corrélation de 0,46. Néanmoins cette corrélation n'est pas linéaire mais en « triangle » (Fig. 7), démontrant que des taux de germination élevés sont toujours associés à des proportions élevées de *C. dupreziana*.

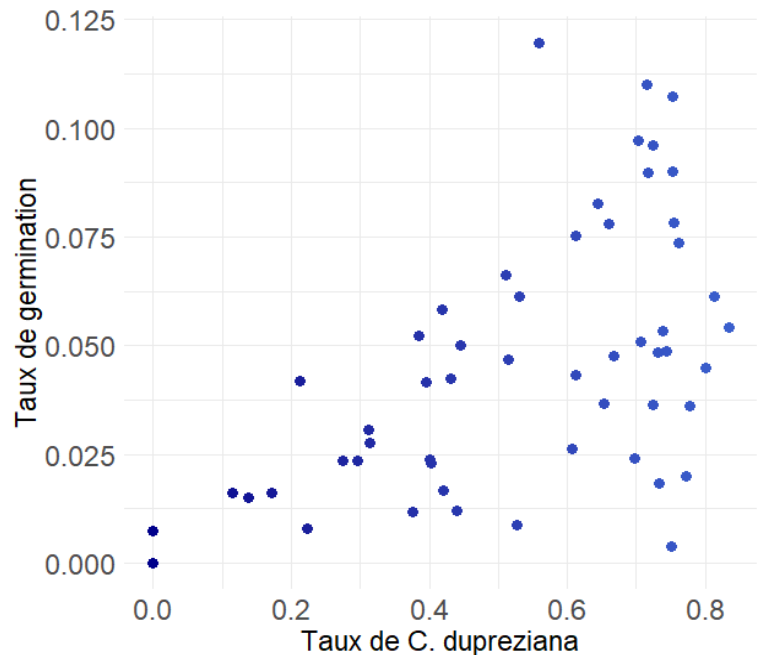


Fig. 7 Corrélation entre les taux de germination et de plantules de *C. dupreziana* (par « mère »)

Caractérisation des graines/plantules par espèce

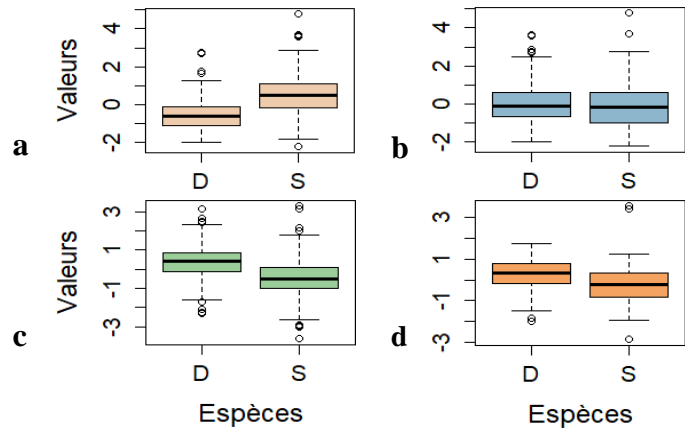
Le stade de développement des espèces permettant la distinction entre *C. dupreziana* et *C. sempervirens* a été évalué sur des caractéristiques des graines et des plantules. Bien que légèrement corrélées à l'espèce, la taille des graines (estimée pour 2167 graines) ne peut être utilisée efficacement à cette fin.

L'analyse colorimétrique des cotylédons a été réalisée par une analyse discriminante linéaire sur 2 sous-groupes, l'un englobant l'ensemble des photos (Groupe 1 - 339 cotylédons), l'autre se focalisant uniquement sur le dernier stade de la plantule avant son transfert en pépinière (Groupe 2 - 130 cotylédons). La combinaison linéaire de la couleur et des rapports de couleur utilisés comme variables discriminantes a conduit à une faible distinction entre les espèces, les couleurs de cotylédons ayant tendance à s'harmoniser avec l'âge des plantules (Fig. 10ab). La différence était principalement due à la couleur verte, plus élevée chez *C. dupreziana*. Sur la base de 1000 estimations bootstrap, la probabilité d'attribution correcte à une espèce était d'environ 0,7, allant de 0,6 à 0,8.

Fig. 10a-d

Distributions des estimations colorimétriques entre *C. dupreziana* et *C. sempervirens*, avec :

- a** Les variables vert, rouge, ratio bleu/vert, ratio bleu/rouge, ratio rouge/vert (Groupe 1).
- b** Les variables vert, rouge, ratio bleu/vert, ratio bleu/rouge, ratio rouge/vert (Groupe 2).
- c** La variable vert uniquement (Groupe 1).
- d** La variable vert uniquement (Groupe 2).



Discussion

Les résultats de nos analyses, menées sur plus de 100 000 graines, démontrent que les taux de germination et la proportion d'embryons de *C. dupreziana* par rapport à ceux de *C. sempervirens* sont très significativement corrélés aux arbres mères et à leur provenance. Les différences constatées entre eux sont probablement liées, non pas à leur génome, mais à leurs conditions d'exposition aux pollens. Pour les taux de germination, la variabilité entre les sites dépendrait majoritairement du climat au moment de la pollinisation, alors que les taux de *C. dupreziana* semblent davantage influencés par l'âge des mères. Il est intéressant de noter à ce propos que le massif de l'Esterel, qui compte parmi les plus grandes et plus anciennes concentrations de cyprès du Tassili en France, présentait en 2001 un taux de germination global s'étalant de 0,22% à 3,9% avec un taux moyen de *C. dupreziana* de 23% (Nava, 2008). En 2023, nous constatons pour ce même massif des taux oscillant de 2,3% à 11,9% pour la germination, et une proportion moyenne de *C. dupreziana* atteignant 76,2%. Il est fort probable que la maturation de l'arbre soit en mesure d'expliquer ce phénomène. L'augmentation de la production de pollen avec l'âge engendre une pollinisation plus grande des individus, et donc des taux de germination et surtout de *C. dupreziana* plus élevés. Dans la perspective d'une reproduction massive de l'espèce, cela suggère d'orienter la récolte de graines sur les arbres les plus âgés et, si possible, de contrôler leur bonne pollinisation (de mi-janvier à mi-février) 1,5 an avant la récolte, en observant la couleur du feuillage de l'arbre lorsque les cônes mâles situés à l'extrémité des rameaux courts virent au jaune.

En ce qui a trait aux phénotypes de *C. dupreziana*, et toujours dans l'optique d'une production de plants à grande échelle, il semble difficile d'identifier avec certitude l'espèce des plants avant qu'ils n'aient atteint leur premier mois, bien que des anomalies morphologiques plus ou moins prononcées chez les plants restent un bon indicateur de *C. sempervirens*. Il nous a semblé intéressant de poursuivre ces recherches par une approche par spectroscopie proche infrarouge (NIRS). Cette technique rapide et facile à mettre en œuvre est aujourd'hui largement utilisée dans l'industrie agricole pour déterminer la structure interne des semences et s'assurer qu'elles ne contiennent pas de

défauts (Pansare et al., 2012; Nicolai et al., 2014). Pour cette raison, nous avons entamé des études en ce sens dont les conclusions restent à venir.

L'étude et la multiplication du Cyprès du Tassili présentent au moins trois intérêts majeurs. Il s'agit d'abord de préserver en conditions ex-situ une espèce au bord de l'extinction dans son aire d'origine. Bien que ses caractéristiques exceptionnelles lui aient permis de traverser les siècles dans des conditions extrêmes, sa disparition dans le désert est aujourd'hui fortement envisagée. D'autre part, son intégration aux forêts françaises, et dans d'autres sites méditerranéens, offrirait une perspective prometteuse d'évolution vers des écosystèmes mieux adaptés aux futures conditions environnementales. Cependant, en l'absence d'évolution adaptative, ce cyprès devrait être implanté sporadiquement, comme essence d'accompagnement ou en tant qu'espèce ornementale. L'installation de peuplements monospécifiques sur de grandes surfaces pourrait présenter des risques, notamment en cas d'attaques parasitaires. Enfin, sa stratégie unique de « mère porteuse » ouvre un vaste champ de recherches pour étudier les gymnospermes, leur variabilité génétique ou l'expression de gènes récessifs. La production de lignées haploïdes est d'ores et déjà mise à profit pour la sélection de variétés ornementales non pollinisantes afin de à prévenir l'allergie au pollen de Cupressacées. Ces lignées sont également utilisées dans le cadre du séquençage du génome du cyprès vert (INRAe, 2023) et pourraient être étendues, à terme, à la production de variétés sélectionnées pour leur croissance rapide ou encore leur résistance aux pathogènes.

C. Laguerre a souligné que la France abritait quatre fois plus de spécimens de *C. dupreziana* que le plateau du Tassili n'Ajjer (Laguerre, 2006). La mise à jour de son inventaire a permis de porter ce nombre à sept, en dénombrant plus de 1500 arbres, la plupart installés dans le sud-est de la France (Annexe 1). Si l'on considère que la survie de cette espèce semble étroitement tributaire des actions humaines en sa faveur, cette augmentation est source d'encouragement, d'autant plus qu'elle ne tient pas compte des 3139 individus de notre production actuellement en pépinière. Nous regrettons cependant que ces arbres ne soient pas totalement représentatifs de la population relictuelle. L'inventaire actualisé et les travaux de L.Nava indiquent que la plupart des graines utilisées dans les collections ex-situ proviennent de Tamrit, la région de l'aire naturelle la plus facilement accessible. Bien que cette espèce présente un génome quasi-unique, des variants ont été détectés sur des échantillons en provenance du nord de l'aire naturelle (Nava, 2008). Les connaissances relatives à son patrimoine génétique font défaut, et il serait essentiel d'y remédier en mobilisant l'ensemble des ressources de l'aire naturelle, ce qui pourrait être facilement réalisé en collectant des graines ou des greffons sur les 233 arbres encore en vie.

Références Bibliographiques

- *ABDOUN, F. (2002) État de conservation du cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana*) au Sahara central ; une espèce en voie d'extinction ? *Ecologia Mediterranea*, 28, 103–103.
- *ABDOUN, F. & BEDDIAF, M. (2002) *Cupressus dupreziana* A. Camus : répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central. *Comptes Rendus Biologies*, 325, 617–627.
- *CHAD, SHELDON ET AL. (2007) Saudi Aramco World (Magazine), September / October (Sept./Oct.) 2007 - Ruins at Patura, Turkey First Edition Magazine, IOBA, pages 32-39.
- *BOIVIN, T. & AUGER-ROZENBERG, M-A. (2016) Native Fruit, Cone and Seed Insects in the Mediterranean Basin. In pp. 47–88.
- *DUBIEF, J. (1999) L'Ajjer, Sahara central. KARTHALA Editions.
- *EL MAËTAOUI, M. & PICHOT, C. (2001) Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus: evidence for meiotic defects yielding unreduced and abortive pollen. *Planta*, 213, 543–549.
- *GRIM, S. (1982) Inventaire Des Cyprès de Duprez Dans Leur Aire Spontanée (Mission Grim, 1971 - 1972).
- *INRAE (2023) *Cupressus sempervirens* isolate:cs-2001-9-10 (ID 833966) - BioProject - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/833966> [accessed 30 July 2023].
- *ITAB (2013) Qualité et santé des semences. *Institut de l'agriculture et de l'alimentation biologiques*. <http://www.itab.asso.fr/activites/sem-qualite.php> [accessed 30 July 2023].
- *LAGUERRE (2006) Inventaire des ressources d'une espèce menacée: le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A.Camus). Mémoire bibliographique M2 (URFM-INRAe), INRAe.
- *MEDAIL, F. (2019) L'extrême résistance du cyprès saharien. *Espèces - Revue d'Histoire naturelle*, 32, 32–39. Kyrnos publications.
- *MERCURI, A.M., G, T. & MARIOTTI LIPPI, M. (1998) New pollen data from the Uan Muhuggiag rockshelter (Libyan Sahara, VII-IV millennia BP). In *Wadi Teshuinat. Palaeoenvironment and Prehistory in South-western Fezzan (Libyan Sahara)* pp. 107–124.
- *NAVA, J., BUONAMICI, A., GIOVANNI GIUSEPPE, V. & PICHOT, C. (2009) Molecular evidence for the natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* seed trees. *Heredity*, 104, 185–190.
- *NAVA, J.L.R. (2008) Stratégie mère porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus (cyprès du Tassili). Analyse, conséquences et perspectives. phdthesis, Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3).
- *NICOLAÏ, B., DEFRAEYE, T., DE KETELAERE, B., HERREMANS, E., HERTOOG, ET AL. (2014) Nondestructive Measurement of Fruit and Vegetable Quality. *Annual review of food science and technology*, 5.
- *OREN, R. & SHERIFF, D.W. (1995) 2 - Water and Nutrient Acquisition by Roots and Canopies. In *Resource Physiology of Conifers* (eds W.K. Smith & T.M. Hinckley), pp. 39–74. Academic Press, San Diego.
- *PANSARE, V., HEJAZI, S., FAENZA, W. & PRUD'HOMME, R.K. (2012) Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores and Multifunctional Nano Carriers. *Chemistry of Materials: A Publication of the American Chemical Society*, 24, 812–827.
- *PICHOT, C., EL MAËTAOUI, M., RADDI, S. & RADDI, P. (2001) Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature*, 412, 39–39. Nature Publishing Group.
- *PICHOT, C., LIENS, B., NAVA, J., BACHELIER, J. & MAËTAOUI, M. (2008) Cypress Surrogate Mother Produces Haploid Progeny From Alien Pollen. *Genetics*, 178, 379–383.
- *PIYATIDA INPITAK & UDOMPIJITKUL, P. (2022) Effect of household sanitizing agents and electrolyzed water on Salmonella reduction and germination of sunflower and roselle seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 370, 109668.
- *QUEZEL, P. (1978) Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65, 479.
- *SEBASTIANI, F., BUONAMICI, A., FINESCHI, S., RACCHI, M., RADDI, P. & GIOVANNI GIUSEPPE, V. (2005) Novel polymorphic nuclear microsatellites in *Cupressus sempervirens*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 393–394.
- *TRISTRAM, H.B. (1860) The great Sahara: wanderings south of the Atlas Mountains. J. Murray, London.
- *VENAIL, P., FRESILLON, C., PILLAIRE, M.J. & PERRIN, E. (2017) Les cahiers de prévention - Risques biologiques, 78–79.

Annexe 1

Inventaire national

De 2006 à 2008, Laguerre et Nava (Nava, 2008) ont établi un recensement assez exhaustif des ressources françaises du Cyprès du Tassili, identifiant ainsi 1026 arbres sur l'ensemble du territoire métropolitain. Afin de suivre l'évolution de cette ressource, il semblait désormais opportun d'actualiser l'inventaire en vérifiant la persistance des arbres connus et en ajoutant de nouveaux individus. Pour ce faire, une enquête a été menée auprès des personnes déjà identifiées et étendue à plus de 190 arboretums ainsi qu'aux principaux organismes publics, associations et collectionneurs privés. Un fichier a été créé contenant toutes les informations relatives aux arbres inventoriés, notamment leur altitude, leur âge, le substrat sur lequel ils se développent ainsi que l'origine de l'information et les coordonnées des propriétaires.

Le recensement a permis de considérer la disparition d'une cinquantaine d'arbres, notamment sur les communes de Carpentras et de Montfavet. Cependant, les plantations de plusieurs propriétaires privés, d'arboretums et la redécouverte d'anciennes placettes expérimentale du FCBA³ ont globalement augmenté le nombre de représentants de l'espèce sur le territoire national, que nous avons pu évaluer à 1564 individus. La figure 11 illustre leur répartition, en signalant en rouge les sites ayant servi de base pour cette étude.

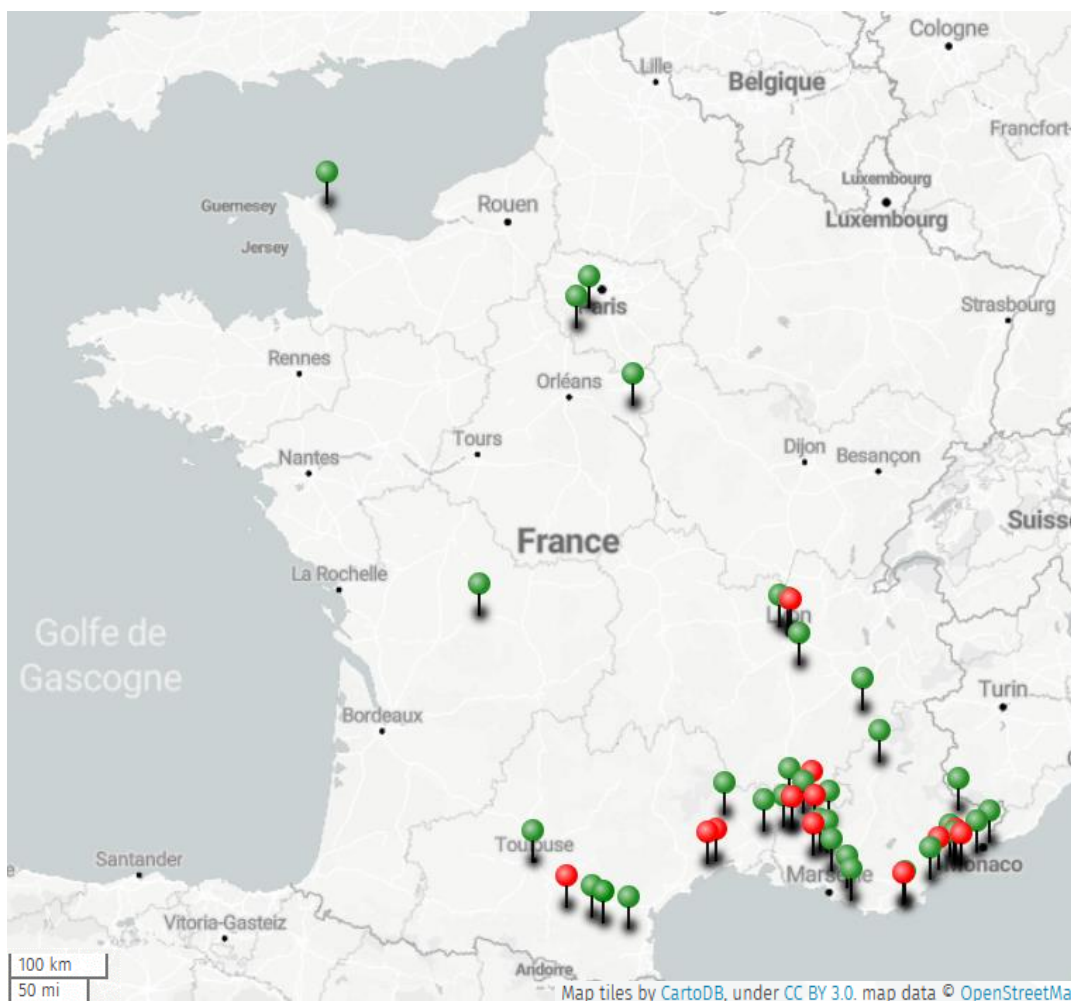


Fig. 11 Répartition des ressources françaises de *C. dupreziana* (en rouge les sites échantillonnés)

³ FCBA : Institut Technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement