



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-memoires-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>

2015-2016

MASTER FAGE

Biologie et Écologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité

BIA – Biologie Intégrative de l'Arbre et des Plantes Cultivées

**MODIFICATIONS QUALITATIVE ET QUANTITATIVE EN
COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LES FEUILLES DE
HÊTRE SOUMISES À DES CONTRAINTES ABIOTIQUES**



RAPHAËL C. V. HEYMES

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 06/09/16

Encadrants : Anthony GANDIN, Maître de Conférences (UMR EEF) et
Yves JOLIVET, Professeur d'Université

Enseignant référent : Nicolas ROUHIER, Professeur d'Université (UMR IAM)

INRA, Champenoux – UMR EEF, Campus des Aiguillettes Nancy

Sommaire

Introduction

I. Des stress de plus en plus intenses pour le Hêtre et d'autres espèces forestières.....	3
II. Effets biochimiques et physiologiques des stress sur l'arbre	4
III. Les composés phénoliques végétaux : caractéristiques, rôles dans la défense	4
Cadre du stage & objectifs	6

Matériel & Méthode

Matériel végétal & traitements	6
Mesures non-destructives in vivo.....	7
Dosages colorimétriques	7
Chromatographie en phase liquide à haute performance	8
I. Composés phénoliques	8
II. Ascorbate.....	8
Analyses statistiques	8

Résultats

Estimation du Nitrogen Balance Index & du pool de phénols épidermiques (flavonols et anthocyanes).....	9
Quantification des composés phénoliques totaux	11
Ascorbate.....	11
Aspects qualitatifs	12
I. Variations spécifiques entre les traitements et la hauteur des feuilles	12
II. Profils carbonés des phénols identifiés	13

Discussion

Profil saisonnier des flavonols & des anthocyanes	14
Données qualitatives en relation avec les traitements et la hauteur des feuilles	15
Un exemple de mise en relation de résultats entre Flav, phénols totaux et Anth.....	16
Un antioxydant, l'ascorbate et son rôle dans le recyclage des phénols antioxydants	17
Aspects sur la gestion des ressources carbonées	18

Conclusion

Référence bibliographique
Résumé / Abstract

Introduction

La forêt française, en constante expansion depuis les Révolutions Industrielles, couvre aujourd'hui près de 30% du territoire métropolitain. Elle est majoritairement constituée de feuillus (64%) : le Chêne pédonculé, le Chêne sessile ainsi que le Hêtre (10% en terme de volume de bois sur pied) en sont les espèces dominantes [IGN, inventaires de 2010-2014]. Le Hêtre commun (*Fagus sylvatica* L. 1753) est donc une essence particulièrement étudiée dans les sciences forestières en Europe. Elle est également d'un intérêt économique certain, le bois de Hêtre est utilisé comme bois-énergie, bois d'œuvre (menuiserie notamment) et bois d'industrie (papeterie) [Štajner et al., 2012].

I. Des stress de plus en plus intenses pour le Hêtre et d'autres espèces forestières

En sa qualité d'essence indigène, le Hêtre est bien adapté au climat tempéré humide couvrant la majeure partie du centre et du nord de l'Europe. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'augmentation du CO₂ atmosphérique et de la température, majoritairement causée par les activités anthropiques, seraient bénéfiques pour la productivité du Hêtre en Lorraine [Bontemps et al., 2005 ; Fabian et Menzel, 1999]. Le CO₂ atmosphérique agirait alors ici comme un « fertilisant » carboné et permettrait également une économie d'eau du sol, selon les travaux (review) de Tyree et Alexander [1995], grâce à une diminution de l'ouverture des stomates tout en maintenant une forte assimilation photosynthétique. Une température de l'air plus élevée entraînerait quant à elle une saison de végétation plus longue (étude sur l'Europe entière [Chmielewski et Rötzer, 2001]).

D'une manière générale la partie nord de l'Europe est considérée comme plus favorable aux Hêtres, y compris dans le contexte des changements climatiques futurs [Piedallu et al., 2009] ; cependant ces zones géographiques pourraient connaître des inondations de plus en plus fréquentes dues à des précipitation plus importantes au printemps et en automne [Lehner et al., 2006]. En ce qui concerne la partie sud de l'Europe (territoires sud-alpins et Balkans notamment), les populations de Hêtres seraient d'avantages menacées ; l'augmentation prévue des températures créant ainsi des périodes de sécheresse (déjà existante à l'heure actuelle) de plus en plus intenses et fréquentes [Lehner et al., 2006 ; Jump et al. 2006].

De nombreux stress abiotiques délétères pour la flore coexistent dans la nature et s'intensifieront dans l'avenir, nous avons cité précédemment la sécheresse édaphique et les précipitations extrêmes. L'augmentation prévue des températures pourraient également accroître l'importance de certains stress biotiques comme l'apparition de phénomènes de compétition entre arbres indigènes et essences ayant « migrées » et pouvant potentiellement acquérir un caractère invasif.

Les insectes ravageurs peuvent être à l'origine d'un autre stress biotique : l'herbivorie. La chenille du papillon *Calliteara pudibunda* est, par exemple, un ravageur spécifique du Hêtre [Heiermann et Schütz, 2007]. Il est possible, avec les changements climatiques futurs, que l'herbivorie devienne de plus en plus intense au sein des écosystèmes. Porter et al. (review) [1991] émettent l'hypothèse que des hivers plus doux, des températures plus chaudes au printemps et en été (en tant qu'êtres vivants poïkilothermes les insectes sont très dépendants du climat) ou encore l'élimination d'un prédateur seraient bénéfiques à certains ravageurs de culture. Il est intéressant de noter que l'appétence du coléoptère *Stereonychus fraxini* pour les feuilles de Frêne est plus importante lorsque l'arbre est stressé (sécheresse édaphique) [Foggo et al., 1994]. Des résultats similaires sont obtenus chez *Pinus edulis* (sécheresse et pauvreté en minéraux du sol) avec la chenille du papillon *Dioryctria albovittella* [Cobb et al., 1997]. Nous pouvons donc à ce moment extrapoler et faire le lien entre arbres stressés par les futurs changements climatiques et intensification de l'herbivorie.

Aujourd'hui, de nombreuses études sont menées sur les capacités de résilience de différentes essences européennes face à différents stress afin de sélectionner les espèces les plus résistantes (exemple [Štajner et al., 2012]) en vue d'un éventuellement « repeuplement » de certaines zones.

II. Effets biochimiques et physiologiques des stress sur l'arbre

L'arbre, en tant qu'être vivant sessile et pérenne, doit constamment répondre aux contraintes que lui impose son environnement. Un stress entraîne généralement une baisse de la productivité d'un arbre, voir son dépérissement s'il est suffisamment intense. La sécheresse édaphique par exemple entraîne chez le Hêtre (même phénomène chez la plupart des arbres) la fermeture des stomates afin de conserver un potentiel hydrique élevé dans les feuilles mais également au niveau du tronc afin d'éviter la cavitation [Tognetti et al., 1995]. En contrepartie il y a réduction de la capacité photosynthétique et donc de la croissance.

L'herbivorie quant à elle prive l'arbre d'une partie de ces ressources (carbonées et azotées) en plus de réduire la surface allouée à la photosynthèse de l'individu.

Outre ces aspects, les dégâts cellulaires provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont présents dans tous les stress rencontrés par les arbres [Štajner et al., 2012 ; Dat et al., 2000]. Les ROS sont issus de la réduction de l'O₂ atmosphérique, ce phénomène peut être constitutif (rôle de signalisation) ou pathologique (stress). Ils sont principalement produits lors de différents mécanismes cellulaires d'importance tels que la photosynthèse (production du radical superoxyde (O₂⁻) dans le PSI ; de l'oxygène singulet (¹O₂) dans le PSII) [Asada, 2006], la respiration (production de O₂⁻ au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie), la photorespiration (production de H₂O₂ par l'action de la glycolate oxydase) [Dat et al., 2000] ou encore la réponse hypersensible (production de O₂⁻ et H₂O₂ lors de la détection de marqueurs moléculaire appartenant à un pathogène connu) [Apel et Hirt, 2004].

La sécheresse, par exemple, induit une production continue de H₂O₂ par le biais de la photorespiration (pénurie de CO₂ dans les cellules de la feuille) chez les plantes en C₃. Au niveau du PSI il peut exister une génération excessive de O₂⁻ si le NADPH (réduit) s'accumule dans le stroma (cycle de Calvin perturbé à cause d'un manque de CO₂ par exemple). Les ROS sont impliqués dans l'oxydation des acides nucléiques, des protéines et des lipides (perméabilisation de la membrane plasmique possible), perturbant ainsi leur bon fonctionnement [Blokhina et al., 2003].

Un arbre résistant à un ou plusieurs stress doit donc être capable de se munir d'une défense antioxydante efficace [Štajner et al., 2012]. Chez les plantes la production de molécules antioxydantes (métabolites ou protéines) est hautement régulée. Nous pouvons citer, par exemple, le Heat Stress transcription Factor gouvernant la transcription de gènes spécifiques lors de différents stress codants pour des enzymes à activité ascorbate peroxydase, glutathion S-transférase et une chaperonne (une heat shock protein) [Guo et al., 2016]. Chez le Hêtre, l'ozone provoque une augmentation de l'activité APX et de la quantité d'ascorbate total (Asc = ascorbate réduit (AsA) + formes oxydées) dans les feuilles chez les arbres poussant en milieu pollué par rapport aux témoins [Rabotti et Ballarin-Denti, 1998].

III. Les composés phénoliques végétaux : caractéristiques, rôles dans la défense

Les enzymes à activité antioxydante du cycle ascorbate-glutathion et les petits métabolites (AsA, glutathion) sont quasi-ubiquitaires chez les êtres vivants. Cependant les plantes produisent également d'autres métabolites de défense d'importance tels que les caroténoïdes, les isoprénoïdes ainsi que les composés phénoliques (ou phénols) ; nous nous concentrerons sur ces derniers.

Les phénols végétaux sont des métabolites « secondaires » majoritairement issus de la voie des phénylpropanoïdes et ayant la L-phénylalanine (L-Phe ou Phe) comme précurseur ; ils peuvent également provenir de la voie du shikimate [Cheynier et al., 2013]. Nous pouvons classer les phénols en fonction de leur nombre de carbone, voici les principales classes : C₆, phénols simples : ils ne sont pas issus de la voie des phénylpropanoïdes ; C₆-C₃, phénylpropanoïdes et coumarines ; C₆-C₂-C₃, stilbènes ; C₆-C₃-C₆, isoflavonoïdes et flavonoïdes : ces derniers sont extrêmement diversifiés, on y retrouve les flavanes, flavanones, flavones, flavonols et anthocyanidines. Il est possible de les différencier grâce au degré d'oxydation de leur hétérocycle central (ci-avant : du plus réduit au plus oxydé) ; (C₁₅)_n, tannins ; (C₆-C₃)_n, lignines. Toutes les formes non-condensées citées précédemment peuvent se retrouver *in planta* sous forme glycosylée, acétylée, méthylée, etc. Il y aura alors intervention de transférases spécifiques [Dai et Mumper, 2010].

Les composés phénoliques occupent de nombreuses fonctions au sein de la plante. On peut notamment citer les couleurs des fruits et fleurs provenant des anthocyanes (anthocyanines glycosylées). Egalement, le rôle de certaines flavones et isoflavonoïdes dans la formation des nodules racinaires chez certaines Légumineuses (allélopathie) est bien connu [Cheynier et al., 2013].

L'aspect défensif de ces métabolites semble particulièrement étudié à l'heure actuelle. Certains composés phénoliques présentent des activités « antioxydantes » : les phénols C₆ tel que le catéchol ainsi que certains flavonols sont capables de chélater des métaux de transition (Fe²⁺, Cu²⁺) [Dai et Mumper, 2010 ; Hernández et al., 2009]. Ces derniers étant connus pour leur rôle pro-oxydant dans plusieurs compartiments cellulaire (réaction de Fenton). Yamazaki et al. [1997] ont montré *in vitro* la capacité de la quercétine et du kaempférol (flavonols) à réduire le H₂O₂ à l'aide d'une peroxydase de raifort avec une très grande efficacité. Ils suggèrent que ce genre de réactions existerait *in vivo*, cependant ces aspects sont encore peu connus. Hernández et al. [2009] (review) soulignent l'existence de formes oxydées réactives de flavonols (de forme semiquinone ou radical phénoxy) qui ne sont pas immédiatement pris en charge par un réducteur. Il serait donc hasardeux de les considérer comme de « véritables » antioxydants même si les auteurs suggèrent une réduction rapide médié par l'AsA au sein du chloroplaste.

La formidable capacité qu'ont certains phénols à céder très facilement leurs électrons pourrait en fait ne pas servir uniquement à la lutte contre les ROS. Les phénomènes d'oxydations médiés, cette fois-ci, par des enzymes (laccases, catéchol oxydases et peroxydases) seraient en fait un moyen de créer des molécules aux propriétés nouvelles. Nous pouvons prendre l'exemple suivant : un flavonol qui est un antioxydant « classique » est oxydé formant ainsi un flavonol o-quinone (antimicrobien) lui-même oxydé pour créer une forme condensée, la proanthocyanidine (écran contre les UV-B) [Pourcel et al., 2006]. Nous pouvons également citer l'élégant mécanisme anti-herbivorie chez la tomate. Après détection du ravageur (stress mécanique) l'acide chlorogénique o-quinone (issus de l'oxydation de l'acide chlorogénique (C₆-C₃ + acide quinique)) forme des liaisons covalentes avec plusieurs protéines habituellement assimilées par l'insecte les rendant ainsi toxiques pour ce dernier [Felton et al., 1992].

En tant que composés de défense, les phénols sont d'avantage sollicités en période de stress. Ainsi l'acide férulique (phénylpropanoïde) est associé avec la résistance à la sécheresse chez le Triticale d'hiver [Hura et al., 2007]. De la même manière, la cyanidine (anthocyane) et la rutine (flavonol) voient leurs concentrations cellulaires augmenter lors d'un traitement aux UV-B sur des pousses de Sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) [Tsurunaga et al., 2013].

Qu'il s'agisse de flavonoïdes (le plus souvent glycosylées), de tanins ou de lignines les phénols végétaux sont des molécules riches en carbone, une ressource dont l'allocation et l'utilisation sont finement régulées au sein de l'arbre. Louis et al. [2012] ont montré que la quantité de flavonols (mesures au Dualox, Cf *Matériels & Méthodes* | *Mesures non-destructives in vivo*) dans l'épiderme était plus élevée dans les feuilles de lumière par rapport aux feuilles d'ombre (Hêtres de 30 ans). Nous retrouvons des résultats similaires (ici, flavonoïdes totaux) dans les travaux

de Häberle et al. [2009] chez des jeunes Hêtres de 1 an. Les mêmes auteurs mettent également en évidence une quantité plus faible de phénols totaux dans les feuilles de lumière par rapport aux feuilles d'ombre ; l'important pool de flavonoïdes étant contrebalancé par un pool de lignines moins conséquent. Une quantité plus importante est par contre existante chez les feuilles de lumière de l'Épicéa commun (*Picea abies*) par rapport aux feuilles d'ombre. L'utilisation du carbone pour la défense semble être espèce-dépendante dans ce cas. Chez le Chêne, des expériences d'écorçage ont mis en évidence l'existence de deux pools de flavonol, un pool « constitutif » et un autre issu d'une allocation de carbone vers des feuilles matures [Louis et al., 2009]. Cependant nous n'avons pas encore d'informations quant aux importances respectives de ces deux pools en situation de stress

Cadre du stage & objectifs

Le stage a été réalisé au sein de l'UMR EEF (Ecophysiologie et Ecologie Forestière), unité rattachée à l'INRA et à l'Université de Lorraine. Ses principaux axes de recherche sont le fonctionnement intégré de l'arbre, l'écologie forestière ainsi que les mécanismes de réponses aux contraintes.

Plus précisément, le sujet du stage s'inscrit dans le projet de recherche multidisciplinaire MEPiB-DEATH (*Morphological and Ecophysiological Processes leading to Beech tree Death*). Projet dans lequel différentes équipes scientifiques cherchent à élucider les processus biologiques menant à la mort du Hêtre. Les disponibilités en ressources carbonées et azotées ainsi qu'en eau dans différents organes de l'arbre en situation de stress sont donc particulièrement étudiées. Un autre volet du projet s'intéresse quant à lui aux métabolites secondaires de défense que constituent les phénols végétaux. Il sera donc question au cours du stage de l'étude de leurs implications en situation de stress (sécheresse édaphique et manque de photosynthétats).

Les objectifs du stage sont les suivants :

- (i) Etudier les variations quantitatives présentes chez les flavonols et les anthocyanes entre les trois traitements, le caractère feuille d'ombre/feuille de lumière et la période de l'année
- (ii) Etudier les variations quantitatives pour les pools de phénols totaux en fonction du traitement et du caractère feuille de lumière/feuille d'ombre et les comparer avec les données sur les flavonols et les anthocyanes
- (iii) Etudier les aspects qualitatifs (identification de composés phénoliques) face aux traitements ainsi que du caractère feuilles de lumière/feuilles d'ombre
- (iv) Etudier les variations dans les mêmes conditions que précédemment de l'ascorbate et essayer de le relier aux actions des composés phénoliques

Matériel & Méthodes

Matériel végétal & traitements

Les plants de Hêtres, issus de différentes populations lorraines, ont été mis à germer en 2007 à la pépinière du centre INRA de Champenoux (48°45'00.2"N | 6°20'11.0"E). Les conditions de prélèvement de ces graines, le protocole de germination et les conditions de culture ont été présentées dans la thèse de Da Silva [2010]. L'ensemble du dispositif est composé de 1000 arbres répartis en 6 bâches de 24 m de long sur 1 m de large. Chaque bâche comporte 56 rangs de 3 arbres. Au printemps 2014, un toit en plaque transparentes en polycarbonates a été installé à 5m de haut couvrant ainsi le dispositif. Un filet a été ajouté tout autour du toit pour limiter les apports d'eau

latéraux. 2 des 6 bâches ont été laissées sans eau afin d'induire une sécheresse édaphique tandis que les 4 autres ont été irriguées. Les traitements étudiés sont : le traitement défoliation, 1 feuille sur 4 conservée pour les deux campagnes de défoliation du 2/06 au 17/06/2014 et du 01/06 au 12/06/2015 ; 1 feuille sur 10 pour la campagne du 17/05 au 01/06/2016 ; les deux traitements sécheresse, modérée (appelé « sécheresse » dans ce document) et intense (appelée ici « sécheresse intense »). Dans cette étude, on considère qu'un arbre est en déficit hydrique lorsque le relative water content mesuré à l'aide d'une sonde à neutron [Toxler] est inférieur à 40%. Sur le dispositif expérimental la bâche sécheresse intense présente un REW plus faible de 5 à 10% par rapport à la bâche sécheresse [Levillain, communication personnelle].

Mesures non-destructives in vivo

Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un Dualex Scientific+ [FORCE-A]. Cet appareil consiste en une pince à feuille permettant de quantifier le pool de flavonols et d'anthocyanes épidermiques (Flav et Anth) ainsi que le Nitrogen Balance Index (NBI). Les Flav et Anth sont estimés en comparant la fluorescence de la chlorophylle (proche infrarouge) issus d'une première excitation référence (610 nm) à une seconde excitation spécifique du phénol étudié (UV-A pour Flav et vert pour Anth). Une portion de cette onde est absorbée par les phénols épidermiques, le signal restant produit l'excitation de la chlorophylle produisant un second phénomène de fluorescence dans le proche infrarouge. Le pool de chlorophylles (nécessaire au calcul du NBI) est estimé grâce leurs absorbances à 710 nm, une autre émission (proche infrarouge) permet quant à elle de prendre en compte la structure de la feuille afin d'affiner la mesure. En tout, 72 arbres (= 24, contrôle ; 24, défoliation ; 12, sécheresse et 12, sécheresse intense), choisis aléatoirement sur la pépinière, sont testés. Les mesures sont réalisées sur des feuilles matures se trouvant sur des rameaux préalablement marqués. Les deux feuilles appartenant aux deux rameaux les plus exposées au soleil sont considérées comme étant des feuilles de lumière (FL) et inversement pour les feuilles d'ombre (FO). Le Dualex est capable de quantifier les Flav et Anth sur les deux faces de la feuille cependant, lors de cette étude, l'accent sera mis sur les pools totaux de ces deux composés dans la feuille ($\text{Flav} = \text{Flav}_{\text{abaxial}} + \text{Flav}_{\text{adaxial}}$; $\text{Anth} = \text{Anth}_{\text{ab}} + \text{Anth}_{\text{ad}}$). Le NBI se calcule de la manière suivante : $\text{NBI} = \text{Chl} / \text{Flav}$. Les mesures ont été effectuées à plusieurs reprises au cours de la saison de croissance : 22/07/2014, 29/08/2014, 06/05/2014, 20/05/2015, 18/06/2015, 21/07/2015, 10/09/2015, 17/05/2016, 17/06/2016 et 22/07/2016.

Dosages colorimétriques

[Singleton et Rossi, 1965] Les prélèvements d'échantillons foliaires se sont déroulés après deux saisons de traitement (10/09/2015) et en début de saison de croissance (17/05/2016). Pour chaque arbre un lot de feuilles exposées à la lumière soleil (FL) et un lot de feuilles à l'intérieur du houppier sont prélevés (FO). Le matériel végétal est ensuite broyé au mortier et pilon dans de l'azote liquide et les poudres sont poolées en fonction du traitement, du caractère FL/FO et en fonction de la date de récolte (16 échantillons en tout). Ici, pour les tests colorimétriques une seule date de récolte sera montrée, il s'agit de celle du 17/05/16. 80 mg de poudres foliaires conservé à -80°C ont été extraits dans du méthanol 80% (v/v). Les extraits sont ensuite agités pendant 2h à 4°C. Ils sont par la suite centrifugés (5 min / 2000g / 4°C) et deux aliquots du surnageant sont prélevés. L'un d'entre eux est placé dans des tubes contenant du polyvinylpyrrolidone (PVPP) 75% (m/m_{poudres}). Les deux séries de tubes sont ensuite centrifugés (5 min / 2000g / 4°C). 20 µL de chaque extrait sont ajoutés dans les milieux réactionnels contenant du NaHCO₃ 240 mM et du réactif de Folin-Ciocalteu 0,1 N. Les solutions sont laissées à l'obscurité et à température ambiante pendant 2h. En parallèle, une courbe-étalon d'acide gallique est réalisée en suivant le même protocole. Les lectures sont faites à

750 nm sur spectrophotomètre [SAFAS]. Le dosage repose sur la capacité des composés phénoliques à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu créant ainsi un chromophore bleu.

Chromatographie en phase liquide à haute performance

I. Composés phénoliques

L'analyse HPLC des composés phénoliques est réalisée avec le concours du plateau du plateau d'analyse structurale et métabolomique de l'Ensaïa et l'assistance technique de Cédric Paris et Romain Larbat. En raison de casse mécanique sur l'appareil de la plateforme, seule une partie des échantillons a pu être analysée. Les analyses ont été effectuées sur 44 échantillons (= 8, contrôle-FL ; 8, contrôle-FO ; 5, défoliation-FL ; 7, défoliation-FO ; 4, sécheresse-FL ; 4, sécheresse-FO ; 4, sécheresse intense-FL ; 4, sécheresse intense-FO) de poudre foliaire. Seuls les échantillons provenant de la récolte du 17/05/2016 ont été dosés car c'est à cette date que les variations entre traitements sont les plus importantes (Cf **Résultats / Quantification des composés phénoliques totaux**). Les extractions au méthanol 80% ont été effectuées sur les poudres foliaires fraîches (150 mg). Les échantillons sont par la suite centrifugés (3 min / 13000g / 4°C) et resuspendu dans du méthanol 80% après prélèvement des surnageants. Le culot est ainsi relavé trois fois. L'ensemble des surnageants a été poolé, lyophilisé et resuspendu dans du méthanol 50%. 10 µL sont utilisés pour l'analyse HPLC [GILSON]. La séparation est réalisée en phase inverse (C18). La colonne est éluée à l'aide d'un gradient d'une solution de de méthanol/acide formique (0,1%). La phase mobile consiste en une solution de H₂O/acide formique (0,1%). En parallèle, des solutions d'acide chlorogénique, de rutine, d'acide coumarique ainsi que d'acide caféique sont préparées pour les standards.

II. Ascorbate

[Davey et al., 2003] L'analyse HPLC de l'ascorbate a été réalisée avec le concours du laboratoire IAM (site FST, équipe de Nicolas Rouhier) et l'assistance technique de Tiphaine Dhalleine. Les échantillons de poudre foliaire fraîches utilisés sont les mêmes (poolés) que ceux utilisé précédemment (Cf **Dosages colorimétriques**). 100 mg de poudre foliaire a été extrait dans de l'acide métaphosphorique (MPA) 6% (m/m) et de l'EDTA 2 mM (500 µL utilisés) en présence de PVPP (10% m/m_{poudres}). Les échantillons sont ensuite passés au broyeur à billes jusqu'à obtention d'un milieu homogène, puis immédiatement centrifugés (15 min / 14000 rpm / 4°C). Les surnageants sont prélevés et un aliquot de 50 µL est placé dans une solution de DTT 65 mM/Tris-base 130 mM (concentration finales) afin de quantifier le pool d'ascorbate total (Asc). Les extraits sont ensuite dilués au 1/10^{ème} dans le tampon d'extraction et 25 µL sont utilisés pour l'analyse HPLC [Prominence UFLC / Shimadzu]. Une colonne analytique Kinetex en phase inverse (C18), 2,6µm, 110 Å, 100 x 4,6 mm a été utilisée pour la séparation. La colonne est éluée (1 mL/min) durant 20 min à l'aide d'un gradient d'une solution d'acétonitrile (0 à 95%)/acide formique (0,1%). La phase mobile consiste en une solution de H₂O/acide formique (0,1%). La détection se fait dans l'UV à 265 nm. En parallèle, une solution stock pour la courbe-étalon est préparée : AsA à 10 mM dans un tampon MPA 3%, EDTA 1 mM et DTT 2,5 mM.

Analyses statistiques

La significativité des différences entre les traitements et le caractère FO/FL des feuilles est déterminée par des ANOVA à deux voies ($p < 0,05$) réalisées grâce au module Excel XLSTAT. Lorsqu'il existait une différence significative, une analyse de comparaisons multiples a été effectuée à l'aide du test de Tukey. En outre, la distribution des données testées a été vérifiée comme suivant une loi normale

Résultats

Estimation du Nitrogen Balance Index & du pool de phénols épidermiques (flavonols et anthocyanes)

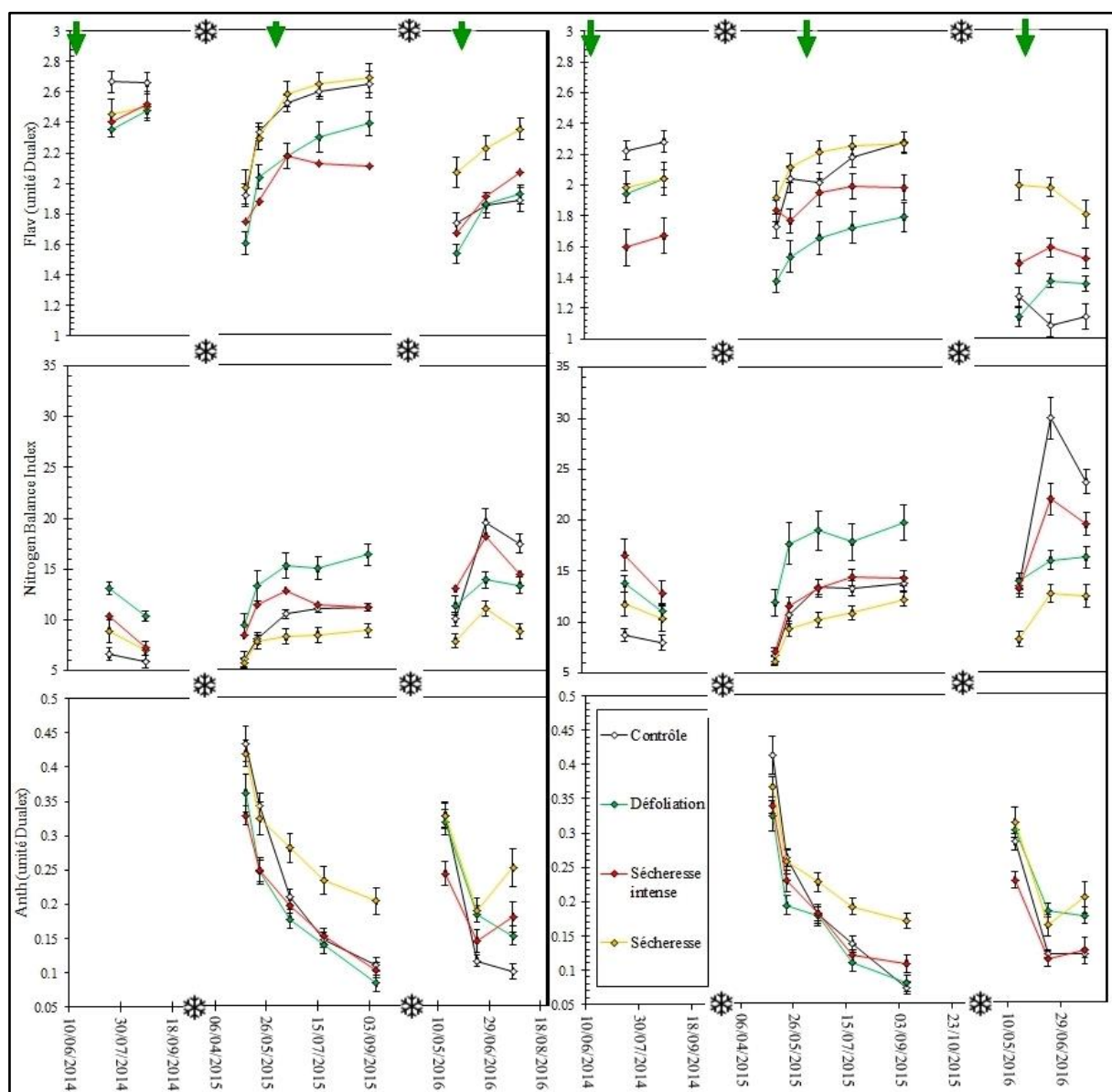


Figure 1 - Mesures des flavonols, anthocyanes et du Nitrogen Balance Index réalisées au Dualex Scientific+. 10 campagnes de mesures ont été réalisées, sur 3 saisons de végétation. **A gauche** se trouvent les résultats pour les FL, **à droite**, les FO ; les flèches vertes représentent les campagnes de défoliation réalisées (leurs durée n'excèdent pas 2 semaines). Les résultats sont donnés en moyenne ($n = 48$, contrôle-FL, contrôle-FO, défoliation-FL, défoliation-FO ; $n = 24$, sécheresse-FL, sécheresse-FO, sécheresse intense-FL, sécheresse intense-FO) complétées par des barres d'erreur (erreur-type).

Le profil saisonnier des Flav (**Figure 1**) pour les FL est le suivant, fin 2014, nous observons assez peu de différences entre les traitements. De mai à septembre 2015, les teneurs en flavonol dans le traitement sécheresse sont similaires à celle du contrôle. Il est d'ailleurs intéressant de constater que, jusqu'au 21/07, le traitement sécheresse intense entraînait une augmentation de la teneur en Flav. Après cette date il entre dans une phase de déclin. Egalement, nous remarquons bien l'effet de la défoliation de 2015 créant une sorte de ralentissement dans l'augmentation des teneurs en Flav dans les feuilles des arbres défoliés. L'année suivante est observée une croissance générale des teneurs en Flav sur les 3 mois pour tous les traitements et notamment pour la sécheresse qui est à présent bien au-dessus du contrôle. Pour les FO à présent, fin 2014 nous observons un contrôle au-dessus des traitements défoliation et sécheresse qui eux sont presque confondus. Finalement le traitement sécheresse intense est très inférieur au contrôle, c'est lui, d'ailleurs qui impacte le plus les teneurs en Flav. De mai à septembre 2015 nous retrouvons à peu de chose près le même motif que dans les FL. Les pools de Flav contenus dans des feuilles d'arbres ayant été défoliés sont très inférieurs au contrôle. Les deux traitements sécheresse quant à eux restent encore relativement proches du contrôle (surtout pour le traitement sécheresse). Toutes les modalités citées précédemment croissent au cours de la saison de végétation. A partir de l'année 2016, les tendances sont plus variables. Le traitement sécheresse est toujours très au-dessus du contrôle, le traitement sécheresse intense passe également au-dessus de ce dernier suivi plus tard par le traitement défoliation.

Fin 2014 le ratio NBI décroît pour tous les traitements. La valeur de NBI pour le traitement défoliation est supérieure au contrôle. L'année suivante une baisse du NBI au niveau du traitement sécheresse intense est observée jusqu'à rejoindre le niveau du contrôle. Le traitement défoliation est toujours supérieur au contrôle pour cette saison tandis que la sécheresse se détache petit-à-petit du contrôle. Début 2016, nous observons une croissance rapide dans un premier temps, suivie d'une baisse sur trois campagnes de mesures et ce pour tous les traitements, on remarque d'ailleurs une valeur de NBI élevée chez le contrôle et basse pour le traitement défoliation. Pour les FO, fin 2014 nous retrouvons à peu près la même tendance que pour les FL mis à part que les traitements défoliation et sécheresse intense présentent un profil inversé. Début 2015 on retrouve presque exactement le même profil que dans les FL mis à part de plus hautes valeurs pour le NBI chez les arbres soumis à la défoliation. Le traitement sécheresse intense est également d'avantage proche du contrôle. Début 2016 nous nous retrouvons encore une fois avec un profil qui ressemble assez aux FL mais cette fois-ci des valeurs de NBI très importantes existe pour le contrôle au mois de juin.

Le profil saisonnier des Anth, début 2015 dans les FL, indique des valeurs similaires dans les traitements défoliation et sécheresse intense, et un peu plus faible chez le contrôle et la sécheresse. La teneur en Anth décroît au cours de la saison dans tous les traitements, mais d'une manière moins soutenue chez le traitement sécheresse. Début 2016, nous retrouvons une baisse de la teneur d'Anth épidermique pour les feuilles d'arbres contrôle et défolié sur les trois campagnes de mesures. Les deux traitements sécheresse, quant à eux, passe par une étape de décroissance suivie d'une croissance 1 mois plus tard. Nous retrouvons exactement le profil des FL chez les FO, mise à part des plus faibles teneurs (mi-juillet) chez les Anth foliaires pour les arbres poussant sous sécheresse intense.

Quantification des composés phénoliques totaux

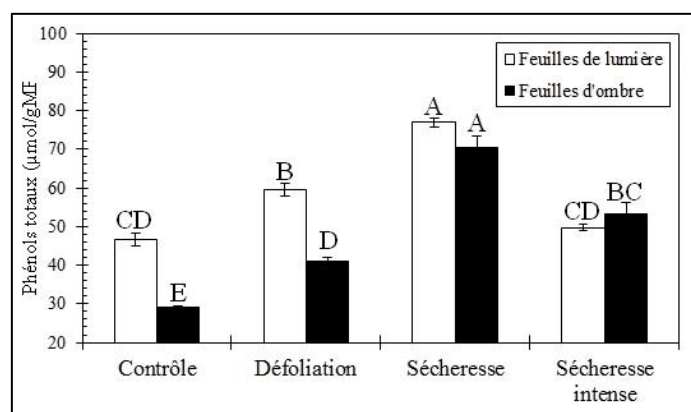


Figure 2 - Variations de la quantité de phénols totaux (exprimées en μmol équivalent acide gallique/gMF) dans des feuilles provenant de Hêtres soumis à la défoliation et à la sécheresse (deux intensités). Est également étudié la hauteur des feuilles sur l'arbre (FL/FO). Les valeurs sont données en moyenne ($n = 3$) complétées par des barres d'erreur (erreur-type).

Nous observons ici (**Figure 2**) une plus haute teneur en composés phénoliques totaux pour le traitement défoliation ainsi que pour le traitement sécheresse dans les FL. Nous trouvons également une différence significative entre sécheresse et sécheresse intense et ce quel que soit l'étage foliaire. Nous retrouvons la même chose dans les FO avec tout de même une différence, une réponse plus intense que le contrôle pour le traitement sécheresse intense. Des variations significatives entre FL et FO sont présentes au niveau du contrôle ainsi que du traitement défoliation en revanche, aucunes différences pour les deux sécheresses

Ascorbate

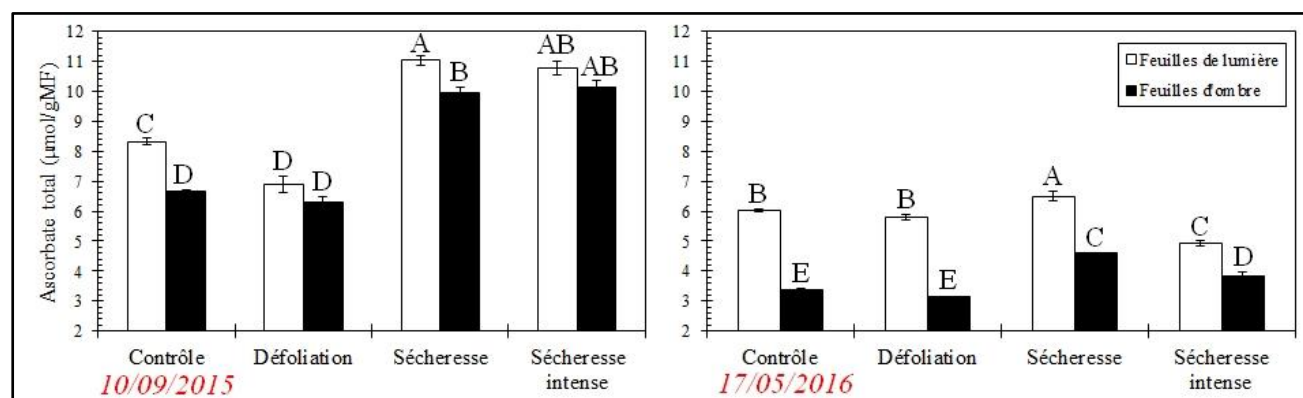


Figure 3 - Variation de la quantité d'ascorbate total dans des feuilles récoltées à deux différentes dates. Sont mises en évidence les différences entre traitement et hauteur des feuilles sur l'arbre (FL/FO). Les valeurs sont données en moyenne ($n = 3$) complétées par des barres d'erreur (erreur-type).

Pour la récolte de 2015 (**Figure 3**), nous observons un pool d'Asc significativement plus faible chez les arbres défoliés par rapport au contrôle dans les FL et l'inverse est observé pour les deux traitements sécheresse. Chez les FO, seuls les deux traitements sécheresse présentent des teneurs d'Asc supérieures au contrôle. Au niveau du différentiel FL/FO, nous trouvons des teneurs d'Asc plus faibles chez les FO du contrôle et du traitement sécheresse. Chez les feuilles récoltées le 17/05/2016, une teneur légèrement plus importante d'Asc pour le traitement sécheresse ainsi qu'une réponse plus faible pour la sécheresse intense par rapport au contrôle sont observés pour la modalité

FL. On notera également la différence d'intensité significative entre la sécheresse et la sécheresse intense. Cette même tendance est présente chez les FO (par rapport à leur contrôle respectif). Nous remarquons également que les quantités d'Asc sont toutes significativement plus faibles dans les FO par rapport aux FL. D'une manière générale (tous traitements et caractères FL/FO), le pool d'Asc est plus important dans les feuilles récoltées le 10/09/2015 que dans les feuilles récoltées le 17/05/2016.

Aspects qualitatifs

I. Variations spécifiques entre les traitements et la hauteur des feuilles

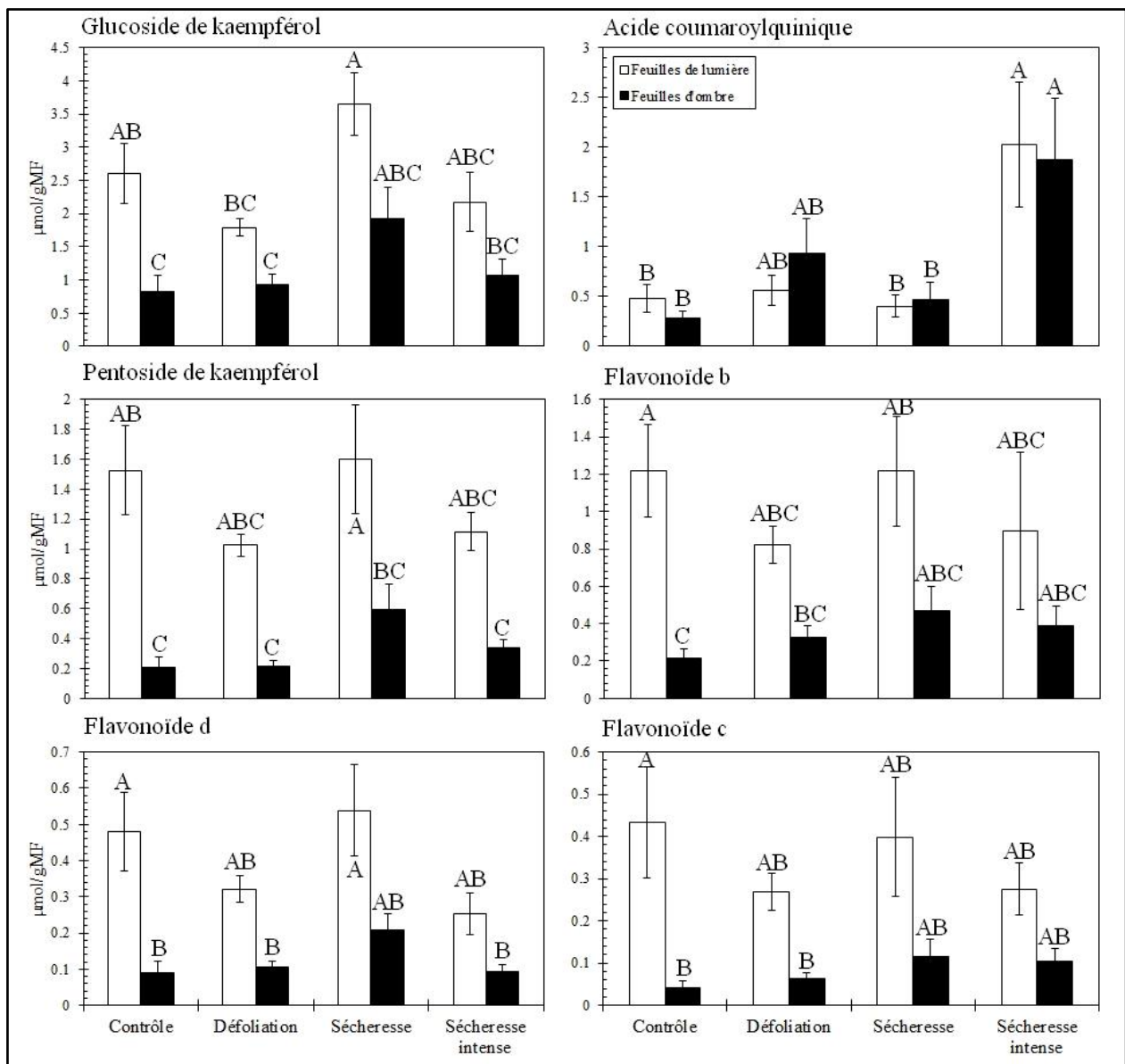


Figure 4 - Variations de la quantité de différents phénols identifiées par HPLC dans des feuilles récoltées le 17/05/2016. Sont étudiées les différences entre traitements et hauteur des feuilles sur l'arbre (FL/FO). Les signaux sont exprimés en : μmol équivalent rutine/gMF pour le glucoside de kaempférol, le pentoside de kaempférol et les flavonoïdes b, c et d et en μmol équivalent acide coumarique/gMF pour l'acide coumaroylquinique. Les valeurs sont données en moyennes (répétitions biologiques | n = 8, contrôle-FL et contrôle-FO ; n = 5, défoliation-FL ; n = 7, défoliation-FO ; n = 4, sécheresse-FL, sécheresse-FO, sécheresse intense-FL et sécheresse intense-FO) complétées par des barres d'erreur (erreur-type).

Tableau I : Liste des 11 phénols identifiés ainsi que leurs temps de rétention. Ils sont ici classés en fonction de l'intensité de leur signal (ordre croissant).

Molécule identifiée	Tps de rét.
Isomère d'acide chlorogénique b	39,5
Acide cafféoylthréonique	35,5
Isomère d'acide chlorogénique a	31,5
Glucoside de kaempférol	62,5
Acide coumaroylquinique	41
Pentoside de kaempférol	63
Flavonoïde b	59
Flavonoïde a	56,5
Flavonoïde d	62
Flavonoïde c	60,5
Isomère d'acide chlorogénique c	47,5

Seuls sont présentés ici (**Figure 4**) les molécules présentant des différences significatives entre les traitements et/ou la modalité FL/FO, voir **Tableau I** pour le détail des identifications. Pour le glucoside de kaempférol, il n'a pas été détecté de différences significatives entre les traitements et le contrôle ou entre les deux intensités de sécheresse quel que soit la modalité FL/FO. La seule différence existante se situe entre les FL et FO chez les arbres contrôle. Concernant l'acide coumaroylquinique la teneur est plus élevée pour les feuilles (FL et FO) d'arbres soumis à la sécheresse intense que chez le contrôle. Nous observons également une forte différence entre sécheresse (quantités plus modestes) et sécheresse intense, toujours chez les deux modalités FL/FO. Les analyses statistiques sur le profil du pentoside de kaempférol ne montre aucunes différences entre les traitements par rapport au contrôle et ce quel que soit la hauteur des feuilles. En revanche, un différentiel FL/FO existe pour le contrôle et pour le traitement sécheresse. Pour les flavonoïdes b, c et d nous retrouvons les même différences significatives que chez le glucoside de kaempférol au niveau du contrôle (modalité FL/FO).

II. Profils carbonés des phénols identifiés

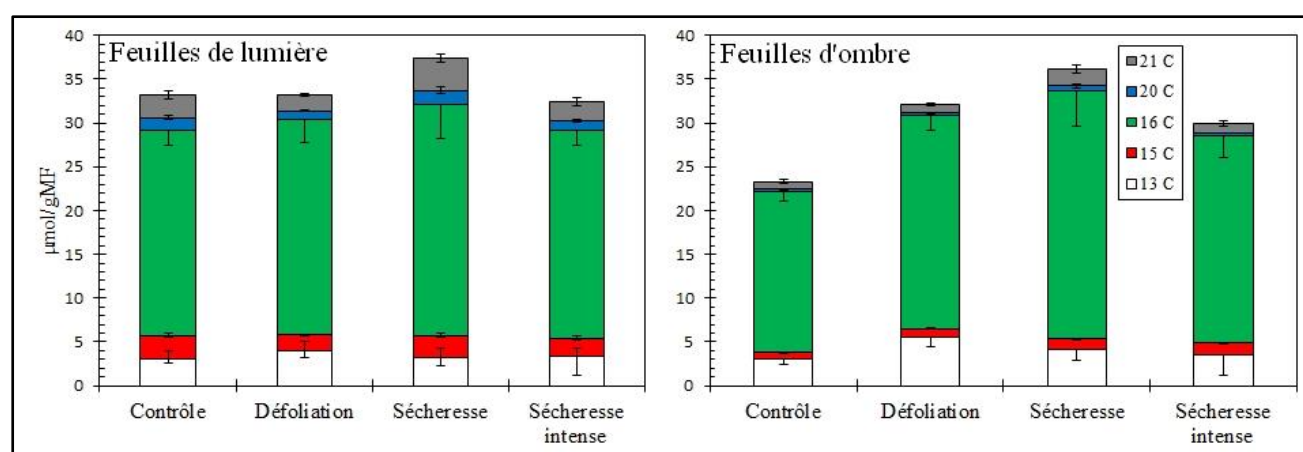


Figure 5 - Détail de la réponse aux stress et à la modalité FL/FO en fonction de la quantité d'atome de carbone portée par chaque molécule identifiée par HPLC [Tableau I]. Les résultats sont donnés en sommes de moyennes ou en moyennes. Les quantités de carbone sont les suivantes : acide cafféoylthréonique, 13 ; flavonoïdes a, b et c, 15 ; acide coumaroylquinique, 16 ; isomère d'acide chlorogénique a, b et c, 16 ; pentoside de kaempférol, 20 et glucoside de kaempférol, 21. Les données sont complétées par des barres d'erreur (erreur-type).

Les quantités en composés phénoliques à 13, 15 et 16 atomes de carbones ne semblent impactées par aucun traitement dans les FL (**Figure 5**). En ce qui concerne les composés à 20 carbones il existe des différences entre les traitements par rapport au contrôle. Le défolié et le traitement sécheresse intense semble plus faible que le contrôle. Pour les molécules à 21 C également, le traitement sécheresse est supérieur au contrôle, le traitement défoliation est quant à lui inférieur au contrôle. Il semble en revanche ne pas y avoir de différences entre le contrôle et la sécheresse intense.

Dans les FO cette fois-ci. Pour les 13 C, il n'existe pas de différences entre le traitement sécheresse intense et le contrôle. En revanche il existerait un plus gros « stock » de 13 C chez les feuilles (FO) de Hêtre subissant des traitements de défoliation. Il semble y avoir une différence pour les 15 C, encore une fois de plus gros « stocks » sont existants pour les deux sécheresses. Il ne semble y avoir de différences significatives entre les traitements pour les 16 C. En revanche, pour les 20 et 21 C, on n'en retrouve le plus dans les feuilles des arbres soumis à la sécheresse et non au niveau du traitement sécheresse intense où les teneurs en 20 et 21 C semblent similaire au témoin dans les FO.

Discussion

Profil saisonnier des flavonols & des anthocyanes

Durant la première année (2014), nous observons pour le traitement défoliation (toute première mesure) une teneur en Flav relativement plus faible par rapport au contrôle (**Figure 1**). Ceci semble cohérent dans la mesure où la défoliation va induire une perte soudaine et importante (75% en 2014 et 2015 et 90% en 2016) de ressources carbonées foliaires, amenant potentiellement les arbres à faire des économies dans leur gestion du carbone qui touchent apparemment les métabolites secondaires de défenses [Keinänen et al., 1999]. D'ailleurs cette limitation en carbone est visible sur les graphiques du NBI (**Figure 1**) suggérant un déséquilibre dans le ratio N/C au profit de la teneur en azote. En outre, en 2014 les deux traitements sécheresse indiquent des teneurs en flavonols inférieures au contrôle. La sécheresse édaphique entraîne une production de ROS dans les cellules ces derniers causent des dégâts aux macromolécules mais également éventuellement aux petits métabolites comme les flavonoïdes [Takahama, 1988]. De plus, au niveau physiologique la sécheresse augmente la fermeture des stomates, rendant ainsi l'assimilation du CO₂ et donc la production de molécules carbonées (tels que des molécules de réponse aux stress) plus difficile. Étonnement chez les FO, les teneurs en flavonols lors du traitement sécheresse intense diminuent plus fortement que pour les FL. D'ordinaire la modalité FO, minimisant l'exposition de certaines feuilles à la lumière du soleil, a tendance à adoucir les stress saisonniers ou anthropiques [Logan, 1998] (**Figure 2**, un exemple chez les phénols totaux). D'ailleurs à partir de l'année 2015, l'effet bénéfique du caractère FO est présent (**Figure 1**), les teneurs pour le contrôle sont statistiquement plus proches de celles du traitement sécheresse intense lors de l'avancement de la saison de végétation. Il est fort probable que la croissance des arbres d'années en années augmente la différence d'exposition lumineuse entre FL et FO. Pour les FO toujours, il est intéressant de constater que les arbres défoliés semblent mieux supporter la modalité FL que FO, ceci pourrait s'expliquer par la perte brutale du caractère FO par l'action de la défoliation elle-même. Les FL et les FO ne sont pas biochimiquement et même morphologiquement (FO souvent plus petites) les mêmes (plus de molécule de défense chez FL, plus de chlorophylles chez FO) [Louis et al., 2012]. En ce qui concerne l'année 2016 chez les FL, des températures plus clémentes au printemps ont sans aucun doute permis aux arbres de se doter de capacités antioxydantes (ici Flav) plus importantes et ainsi de limiter les effets néfastes du stress hydrique. Il est possible également que l'on ait affaire à

un effet mémoire répondant aux deux saisons de traitements sécheresse et défoliation précédant le débourrement de 2016.

Concernant les Anth à présent. Il semblerait que les pools d'anthocyanes dans les arbres poussant en condition de stress soient capables de répondre d'une manière assez efficace durant la période de végétation. Au même titre que les flavonols, certaines anthocyanes comme la cyanidine [Rice-Evans, 1995] serait potentiellement des molécules à haut pouvoir réducteur *in planta*. Le pool d'Anth ne cesse de décroître au cours de la saison de croissance, nous pouvons donc imaginer que le pool d'Anth soit transporté au cœur de la feuille dans le mésophylle à proximité des centres de photosynthèse [Gould, 2014]. En condition optimale (physiologique), ce pool d'anthocyanes est aussi voué à diminuer à mesure que la teneur en chlorophylle augmente lors de la croissance foliaire et que la mise en place de l'appareil photosynthétique se fait. On trouve en outre beaucoup d'anthocyanes dans les vacuoles des cellules profondes de la feuille où ils joueraient le rôle d'écrans à UV [Close et Beadle, 2003]. En condition de sécheresse intense, il est intéressant de constater que le NBI (**Figure 1**) n'est véritablement impacté par la sécheresse intense qu'au début de la saison de végétation : la courbe du traitement sécheresse intense se confond avec la courbe contrôle et ceci malgré le déclin constant du pool des Flav-Sécheresse intense. On pourrait donc émettre l'hypothèse que les Anth serviraient ici de « protecteurs » des chlorophylles. Autre fait intéressant, le fait que le traitement défoliation n'ait aucun effet sur les Anth alors qu'il est assez impactant chez les Flav (**Figure 1-Flav**). Pour l'année 2016, étonnement les Anth semblent d'avantage touchés par les stress alors que les Flav en cette période semblent au meilleur de leur forme chez les FL et les FO. On retrouve cependant une sorte de début de décroissance comme il s'était produit en 2015 tout au long de la période de végétation.

Données qualitatives en relation avec les traitements et la hauteur des feuilles

La seule molécule présentant au moins une différence significative entre un traitement et son contrôle est l'acide coumaroylquinique (**Figure 4**), il s'agit d'un ester d'acide cinnamique (phénylpropanoïde) portant un acide quinique. Il semble très bien répondre au traitement sécheresse intense (FL et FO) mais peu au traitement sécheresse ce qui est plutôt original. Il a déjà été détecté chez le Noyer où il a fait l'objet de test de sélection de cultivar [Pereira et al., 2007] mis à part cela la littérature est quasi-inexistante à son sujet. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il n'est sans doute pas un antioxydant puisqu'il s'agit d'un phénylpropanoïde sans structure ortho-dihydroxy au niveau de son cycle. Les autres molécules identifiées sont les suivantes : Les *isomères d'acide chlorogénique* (3-O-cafféoylquinique, 4-O-cafféoylquinique et acide chlorogénique) peuvent présenter des activités antioxydantes [Nakatani et al., 2000] ; l'*acide cafféoylthréonique*, peu de sources mis à part des contre-rendus d'extraction ; les *formes glycosylées du kaempférol*, un flavonol et un antioxydant reconnu [Rice-Evans et al., 1995] ainsi que diverses flavonoïdes, elles sont parfois porteuses d'activités antioxydantes.

Les résultats obtenus sur la **Figure 1-Flav** sont en accord avec Louis et al. [2012] (mesures Dualex sur des Hêtres) en ce qui concerne la réponse différentiel entre FL et FO et dans notre étude le pool de Flav-FO ne dépasse jamais le pool de Flav-FL. Nous retrouvons d'ailleurs la même chose lorsque l'on s'intéresse aux composés phénoliques totaux (**Figure 3**). Si l'on se penche sur les phénols (identifiés par HPLC) présentant les plus grandes différences au niveau de la réponse FL/FO (**Figure 4** et **Annexe I**), on se rend compte qu'il s'agit surtout de flavonoïdes. Comme par exemple le pentoside de kaempférol et les flavonoïdes b et c. Ceci paraît cohérent : bien que les dérivés de l'acide cinnamique (familles des phénylpropanoïdes ; acide caféique par exemple) soient de meilleurs écrans à UV-A et UV-B que les flavonoïdes [Agati et Tattini, 2010], ils ne seraient pas d'une grande utilité au début du printemps dans les FL où les irradiances sont supposées rester assez faibles. Cependant il faut ajouter que nos résultats (**Figure 4**) doivent être exploités avec précaution :

les effets totaux (sommées de tous les profils carbonés) observés **Figure 5** ne recoupent pas entièrement les quantités foliaires en composés phénoliques totaux présentées dans la **Figure 2**. Cela signifie que certains phénols n'ont pas encore été identifiés.

Un exemple de mise en relation de résultats entre Flav, phénols totaux et Anth

Nous commencerons d'abord par parler des FL (autre paragraphe pour FO). Les résultats obtenus **Figure 2** sont du même ordre que ceux réalisés par Nogués et al. [2014] sur *Quercus ilex*. Le traitement défoliation chez les FL entraîne une légère mais significative augmentation de la teneur en phénols totaux dans les feuilles d'arbre de la bâche défolié. Mais ceci n'est pas un véritable stress puisque la campagne de défoliation a commencé le jour même. Cependant on peut imaginer que des arbres déjà fragilisés par 2 campagnes de défoliation (moins de réserves) puissent produire des métabolites de défense pour maintenir leur propre homéostasie. En ce qui concerne les Flav (**Figure 1**), nous observons une réponse plus habituelle, une teneur inférieure pour les feuilles d'arbres subissant une défoliation chaque année. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Tuomi et al. [1984] (défoliation et baisse des phénols totaux). La différence de réponse entre les deux outils expérimentaux suggère que les flavonols épidermiques semblent plus impactés par le manque de ressources carbonées par rapport à d'autres phénols (Cf **Aspects sur la gestion des ressources carbonées**). Le pool d'Anth épidermique (**Figure 1**) n'est, par exemple, pas affecté (égale au contrôle) par le traitement défoliation. Pour le traitement sécheresse, la teneur en composés phénoliques totaux foliaires (**Figure 2**) est plus élevée par rapport au contrôle (FL). La sécheresse édaphique est capable de générer un stress oxydant au sein des feuilles. Il y aurait donc génération d'antioxydants (exemple : kaempférol ou autre flavonoïde (**Tableau 1**)). En ce qui concerne les Flav (**Figure 1**) il existe également une réponse à la sécheresse, les flavonols constituant des antioxydants efficaces [Hernández et al., 2009]. Pour les Anth (**Figure 1**) en revanche il n'existe pas de différences entre le traitement sécheresse et le contrôle, ces molécules ne sont pas que des antioxydants exclusifs, ils occupent quantité d'autres rôles tels que la lutte contre l'herbivorie ou sont impliqués dans la coloration des fleurs et des fruits [Gould, 2004]. Dans le cas de la sécheresse intense nous n'observons pas pour les FL (**Figure 2**) de différence dans les teneurs en phénols totaux par rapport aux arbres contrôles. Ici les capacités antioxydantes phénoliques ne semblent pas pouvoir être mobilisées, elles semblent même plutôt affaiblies par le stress (l'acide coumaroylquinique (**Figure 4**) pourrait ici être impliqué dans le maintien d'un bon niveau de défense antioxydante). Du côté des Flav épidermiques (**Figure 1**) il semble également ne pas exister de différences entre le traitement sécheresse intense et le contrôle. Là encore on peut penser à des défenses antioxydantes affaiblies notamment par la faible disponibilité en photoassimilats due à une fermeture stomatique importante (elle-même produite par la sécheresse). Pour les Anth (**Figure 1**) il existe une différence significative entre le contrôle et la sécheresse intense, ici les Anth semblent totalement dépassés, mais les Flav ainsi que l'action de l'acide coumaroylquinique devrait pouvoir empêcher des dégâts irréversibles tels que la photooxydation.

Les résultats obtenus **Figure 2** montrent chez les FO une plus haute teneur en phénols totaux chez les arbres poussant sur la bâche défoliation par rapport au contrôle. Nous pouvons évoquer à nouveau l'argument ci-avant : des défenses sont là pour maintenir l'homéostasie chez des arbres fragilisés et ce, bien que la disponibilité en ressources carbonées soit limitante. Les phénols pourraient alors agir ici comme métabolites de défense contre l'herbivorie. Le caractère FO entraîne une production moindre de composés phénoliques, nous pouvons expliquer ceci par la régulation par la lumière de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Cette enzyme est la première étape (sauf exception, les tannins par exemple) de la voie de synthèse des composés phénoliques [Jones, 1984]. Pour les Flav dans les feuilles FO (**Figure 1**) nous n'observons, statistiquement, aucune différence entre le contrôle et le défolié. Nous avons donc ici un cas différent des FL. Le caractère FO a permis

ici d' « adoucir » le stress (diminution du stress lumineux peut-être). Il n'y a, par contre, eu aucun changement pour les Anth (**Figure 1**), d'une manière générale on constate que le caractère FL/FO impacte très peu le pool d'Anth. Ceci suggère encore une fois que ces molécules ne sont pas exclusivement des éléments de réponse au stress. La teneur en composés phénoliques foliaires totaux (**Figure 2**) est bien plus élevée que le contrôle pour le traitement sécheresse. Ceci suggère une augmentation de la capacité antioxydante via notamment la production de métabolites secondaires de défenses. Mais le plus intéressant ici est le fait que l'effet provoqué par la sécheresse est si intense qu'elle a réussi à annuler la modalité FL/FO en les rendant statistiquement égales. Pour les Anth (**Figure 1**) nous observons le même schéma que dans les FL à savoir un contrôle quasiment confondu avec le traitement sécheresse. Les résultats sur les phénols totaux (**Figure 2**) montrent une teneur plus élevée en phénol dans les feuilles d'arbres ayant poussés sur la bâche sécheresse intense. L'intensité du stress semble alors avoir été diminuée par le caractère FO, grâce à cela une réponse antioxydante a pu être mise en place.

Un antioxydant, l'ascorbate et son rôle dans le recyclage des phénols antioxydants

Les résultats obtenus **Figure 3** pour chaque hauteur de feuille sont en accord avec les travaux sur *Quercus ilex* de Nogués et al. [2014], dans la plupart des cas, la sécheresse et la sécheresse intense augmentent la quantité d'Asc dans les FL et les FO et aux 2 dates de récolte. Ceci suggère la production d'Asc par les cellules de la feuille pour répondre au stress oxydant généré par le déficit hydrique foliaire. Il est d'ailleurs intéressant de constater que le caractère FO (stress lumineux diminué) semble « protéger » la feuille du traitement à l'exception de la sécheresse intense pour la récolte du 10/09/15. Pour expliquer ceci nous pouvons émettre l'hypothèse d'un stress trop intense. Nous observons néanmoins une baisse entre le contrôle et la sécheresse intense-FL du 17/05/16, nous pouvons relier cet effet encore une fois à un stress trop intense limitant la disponibilité en ressources carbonées (matériaux de base par la production de nouveau phénols). Les travaux sur *Quercus pubescent* de Gallé et al. [2007] mettent en évidence un pool d'Asc plus modeste dans les feuilles lorsque le potentiel hydrique foliaire est inférieur à -3,5 MPa ; une augmentation de ce pool est ensuite observée lorsque les arbres sont à nouveau arrosés. Nous pouvons également citer la plus forte exposition à la lumière comme source de stress supplémentaire [Demmig-Adam et Adams, 1992]. Dans ce cas les composés phénoliques, demeurant stables par rapport au contrôle, seraient alors les principaux éléments de réponse à la sécheresse (**Figures 1 et 2**).

Le traitement défoliation (**Figure 2**) ne présente pas de différence par rapport au contrôle pour la récolte du 17/05/2016. Cette dernière ayant été faite avant la défoliation de 2016, les résultats sont cohérents. Les réserves en ressources carbonées potentiellement inférieures dans l'arbre soumis à des défoliations annuelles ne semblent pas alors avoir d'effet marqué. La récolte du 10/09/15 est faite après une campagne de défoliation, cependant les arbres peuvent avoir eu le temps de produire de nouvelles feuilles. Étonnamment une quantité plus faible d'Asc est détectée dans les FL, il n'existe aucune littérature à ce sujet, mais nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un manque de ressources carbonées (allouées à la production de nouvelles feuilles) soit à l'origine de cette baisse. Bien que cela semble peu probable dans la mesure où les phénols ne sont pas impactés (**Figure 2**) or ils représenteraient une économie plus pertinente.

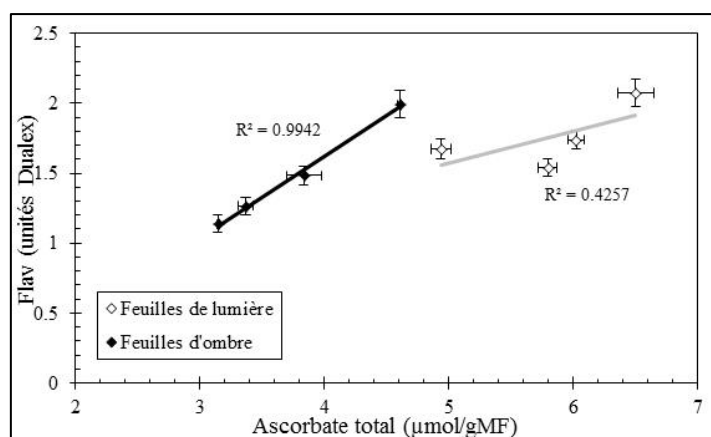


Figure 6 - Corrélations entre la quantité d'ascorbate totale et la quantité de flavonols pour la récolte du 17/05/16. Les valeurs sont données en moyenne complétées par des barres d'erreur (erreur-type)

Dans notre étude, il existe une corrélation entre Asc et Flav pour les FO (**Figure 6**). Ceci suggère qu'un certain nombre de flavonols (comme le kaempférol par exemple) soient réduits de manière spécifique par l'AsA (hypothèse partagée par Hernández et al. [2009]) ou du moins que la cellule produise de l'Asc dans ce but. Les travaux de Bors et al. [1995] montrent *in vitro* que la quercétine et le kaempférol sont capables de recycler l'ascorbate oxydé, ceci pourrait être une autre hypothèse expliquant la corrélation. Seulement cela semble peu probable dans la mesure où l'Asc dispose déjà d'enzymes spécifiques (MDHAR et DHAR). Le fait que la corrélation n'existe que dans les FO suggère que l'Asc produit dans les FL serait d'avantage alloué à la photoprotection. Pour la plus faible corrélation dans les FL, l'hypothèse d'un effet plateau peut également être avancée, où la production de Flav est optimale. Seule la production d'ascorbate est alors stimulée et suffisante afin de maintenir le statu redox du pool de Flav déjà présent. Cette stratégie semble plus intéressante en termes de gestion carbonée. En effet la production de Flav est beaucoup plus coûteuse en carbone que la production d'Asc. En outre la régénération de l'ascorbate peut se faire grâce au pool de pouvoir réducteur cellulaire, celui-ci étant produit de manière optimal sous forte irradiance par la chaîne de transport des électrons photosynthétiques.

Aspects sur la gestion des ressources carbonées

La **Figure 6** nous renseigne, avec certes quelques imprécisions, sur les types de molécules (en fonction de leur nombre de carbone) prenant place dans les réponses aux stress. Il semblerait que chez les feuilles des arbres défoliés tous les ans (à partir du 15/05 environ) il existerait une utilisation de molécules moins coûteuses à produire en termes de coût en carbone. Pour les traitements défoliation-FL il existerait une économie sur les molécules comportant plus de 20 atomes de carbone. On observe les mêmes résultats au niveau des sécheresses intenses-FL, stress limitant lui aussi la disponibilité en ressources carbonées (fermeture des stomates due au stress hydrique). Pour le traitement défoliation-FO, il y a la même tendance avec une accumulation de phénol à 13 C tels que l'acide cafféoylthréonique (**Tableau I**), peu coûteux en carbone mais vraisemblablement important pour la défense cellulaire.

Conclusion

Dans le cadre du projet MEPiB-DEATH, mon étude a visé à clarifier le rôle du métabolisme de défense cellulaire dans la mort du Hêtre exposé à un stress hydrique (modéré ou intense) ou une défoliation. Nous avons pu mettre en évidence un niveau de composés phénoliques totaux significativement plus important sous sécheresse modéré et intense par rapport au contrôle. En outre, la défoliation semble avoir logiquement altéré la disponibilité en ressources carbonées permettant notamment la biosynthèse de flavonols. Les phénols apparaissent alors importants pour la défense cellulaire contre le stress oxydant, notamment en situation de stress hydrique. Cependant, la contribution de ces molécules riches en carbone peut être altérée lorsque la disponibilité en ressources carbonées est faible, notamment lors de défoliation ou de sécheresse intense limitant drastiquement l'assimilation photosynthétique. En complément, nous avons pu identifier une molécule en particulier, l'acide coumaroylquinique, dans cette réponse du métabolisme secondaire aux contraintes environnementales. Finalement, il semble que le rôle des phénols dans la lutte contre le stress oxydant soit fortement corrélé à la disponibilité en ascorbate, qui permettrait de régénérer certains phénols et de maintenir le statu redox d'un pool de composés phénoliques. A l'avenir, il serait intéressant de compléter ces analyses et de comparer les résultats obtenus à l'aide de données météorologiques précises et fiables, qui pourrait expliquer certaines variations au cours de la saison.

Références Bibliographiques

Agati G. et Tattini M.

Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. New Phytologist, 2010, vol. 186, n°4 June 2010, pp. 786-793

Apel K. et Hirt H.

Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, 2004, vol. 55, pp. 373-399

Asada K.

Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology, 2006, vol. 141, n°2, pp. 391-396

Blokhina O., Virolainen E. et Fagerstedt K.

Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress : a review. Annals of Botany, 2003, vol. 91, n°2, pp. 179-194

Bontemps J.-D., Vallet P., Hervé J.-C., Rittié D., Dupouey J.-L. et Dhôte J.-F.

Des hêtraies qui poussent de plus en plus vite : vers une forte diminution de leur âge d'exploitabilité ? Revue Forestière Française, 2005, vol. 57, n°2, pp. 123-142

Bors W., Michel C. et Schikora S.

Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials : a pulse radiolysis study. Free Radical Biology & Medicine, 1995, vol. 19, n°1, pp. 45-52

Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V. et Martens S.

Plant phenolics : recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, vol. 72, pp. 1-20

Chmielewski F.-M. et Rötzer T.

Response of tree phenology to climate change across Europe. Agricultural and Forest Meteorology, 2001, vol. 108, n°2, pp. 101-112

Cobb N.S., Mopper S., Gehring C.A., Caouette M., Christensen K.M. et Whitham T.G.

Increased moth herbivory associated with environmental stress of pinyon pine at local and regional levels. Oecologia, 1997, vol. 109, n°3, pp. 389-397

Close D.C. et Beadle C.L.

The ecophysiology of foliar anthocyanin. The Botanical Review, 2003, vol. 69, n°2, pp. 149-161

- Da Silva E.**
Ecologie du Hêtre (*Fagus sylvatica* L) en marge sud-ouest de son aire de distribution. 2010, thèse de doctorat, Université de Nancy.
- Dai J. et Mumper R.J.**
Plant phenolics extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 2010, vol. 15, n°10, pp. 7313-7352.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D. et Van Breusegem F.**
Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, vol. 57, n°5, pp. 779-795
- Davey M.W., Dekempeneer E. et Keulemans J.**
Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. Analytical Biochemistry, 2003, vol. 316, n°1, pp. 74-81
- Demmig-Adams B. et Adams III W.W.**
Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, vol. 43, pp. 599-626
- Fabian P. et Menzel A.**
Changes in phenology of trees in Europe. In : Causes and consequences of accelerating tree growth in Europe, éditeurs : T. Karjalainen, H. Spiecker, O. Laroussinie, EFI Proceedings, vol. 27, 1999, pp. 43-51
- Felton G.W., Donato K.K., Broadway R.M. et Duffey S.S.**
Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. Journal of Insect Physiology, 1992, vol. 38, n°4, pp. 277-285
- Foggo A., Speight M.R. et Grégoire J.-C.**
Root disturbance of common ash, *Fraxinus excelsior* (Oleaceae), leads to reduced foliar toughness and increased feeding by a folivorous weevil, *Stereonychus fraxini* (Coleoptera, Curculionidae). Ecological Entomology, 1994, vol. 19, n°4, pp. 344-348
- Gallé A., Haldimann P. et Feller U.**
Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. New Phytologist, 2007, vol. 174, n°4, pp. 799-810
- Gould K.S.**
Nature's Swiss Army Knife :The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, vol. 2004, n°5 pp. 314-320
- Guo M., Liu J.-H., Ma X., Luo D.-X., Gong Z.-H. et Lu M.-H.**
The Plant Stress transcription Factors (HSFs) : structure, regulation and function in response to abiotic stresses. Frontiers in Plant Science, 2016, vol. 7, n°114, pp. 1-13
- Häberle K.-H., Nunn A.J., Reiter I.M., Werner H., Heller W., Bahnweg G., Gayler S., Lütz C. et Matyssek R.**
Variation of defence-related metabolites in the foliage of adult beech and spruce : a conceptual approach to approximating traded-off carbon. European Journal of Forest Research, 2009, vol. 128, n°2, pp. 99-108
- Heiermann J. et Schütz S.**
The effect of the tree species ratio of European beech (*Fagus sylvatica* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) on polyphagous and monophagous pest species – *Lymantria monacha* L. and *Calliteara pudibunda* L. (Lepidoptera : Lymantriidae) as an exemple . Forest Ecology and Management, 2008, vol. 255, n°3-4, pp. 1161-1166
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. et Munné-Bosch S.**
How relevant are flavonoids as antioxidants in plants ? Trends in Plant Sciences, 2009, vol. 14, n°3, pp. 125-132
- Hura T., Grzesiak S., Hura K., Thiemt E., Tokarz K. et Wędzony M.**
Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale : accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. Annals of Botany, 2007, vol. 100, n°4, pp. 767-775
- Jones H.**
Phenylalanine ammonia-lyase : regulation of its induction and its role in plant development. Phytochemistry, 1984, vol 23, n°7, pp. 1349-1359
- Keinänen M., Julkunen-Tiitto R., Mutikainen P., Walls M., Ovaska J. et Vapaavuori E.**
Trade-offs in phenolic metabolism of silver birch : effects of fertilization, defoliation, and genotype. Ecology, 1999, vol. 80, n°6, pp. 1970-1986
- Jump A.S., Hunt J.M. et Peñuelas J.**
Rapid climate change-related growth decline at the southern range edge of *Fagus sylvatica*. Global Change Biology, 2006, vol. 12, n°11, pp. 2163-2174
- Lehner B., Döll P., Alcamo J., Henrichs T. et Kaspar F.**
Estimating the impact of global change on flood and drought risks in Europe : a continental, integrated analysis. Climatic Change, 2006, vol. 75, n°3, pp. 273-299

Levillain J.

Communication personnelle

Logan B.A., Grace S.C., Adams III W.W. et Demmig-Adams B.

Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. Oecologia, 1998, vol. 116, n°1, pp. 9-17

Louis J., Meyer S., Maunoury-Danger F., Fresneau C., Meudec E. et Cerovic Z.G.

Seasonal changes in optically assessed epidermal phenolic compounds and chlorophyll contents in leaves of sessile oak (*Quercus petraea*) : towards signatures of phenological stage. Functional Plant Biology, 2009, vol. 36, n°8, pp. 732-741

Louis J., Genet H., Meyer S., Soudani K., Montpied P., Legout A., Dreyer E., Cerovic Z.G. et Dufrêne E.

Tree age-related effects on sun acclimated leaves in a chronosequence of beech (*Fagus sylvatica*) stands. Functional Plant Biology, 2012, vol. 39, n°4, pp. 323-331

Hofmann T et Nebhaj E.

HPLC-MS/MS investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols. In : 30th International Symposium Chromatography, 14-18 Septembre 2014, Salzburg (Autriche), ISC 2014

Nakatani N, Kayano S.-I., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K. et Mitani T.

Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, vol. 48, pp. 5512-5516

Nogués I., Llusà J., Ogaya R., Munné-Bosch S., Sardans J., Peñuelas J. et Loreto F.

Physiological and antioxidant responses of *Quercus ilex* to drought in two different seasons. Plant Biosystems, 2014, vol. 148, n° 2, pp. 268-278

Piedallu C., Perez V., Gégout J.-C., Lebourgeois F. et Bertrand R.

Impact potentiel du changement climatique sur la distribution de l'épicéa, du Sapin, du hêtre et du chêne sessile en France. Revue Forestière Française, 2009, vol. 61, n°6, pp. 567-593

Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Valentao P., Andrade P.B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R. et Estevinho L.

Walnut (*Juglans regia* L.) leaves : Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 2007, vol. 45, pp. 2287-2295

Porter J.H., Parry M.L. et Carter T.R.

The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. Agricultural and Forest Meteorology, 1991, vol. 57, n°1-3, pp. 221-240

Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L. et Debeaujon I.

Flavonoid oxidation in plants : from biochemical properties to physiological functions. Trends in Plant Sciences, 2007, vol. 12, n°1, pp. 29-36

Rabotti G. et Ballarin-Denti A.

Biochemical responses to abiotic stress in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. Chemosphere, 1998, vol. 36, n°4-5, pp. 871-875

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. et Pridham J.B.

The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research, 1995, vol. 22, n°4, pp. 375-383

Singleton V.L. et Rossi J.A.

Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 1965, vol. 16, pp. 144-158

Štajner D., Orlović S., Popović B.M., Kebert M., Stojnić S. et Klačnja B.

Chemical parameters of oxidative stress adaptability in beech. Journal of Chemistry, 2013, vol. 2013, pp. 1-8

Takahama U.

Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in epidermal and guard cells of *Tradescantia virginiana* L.. Plant Cell Physiol, 1988, vol. 29, n°3, pp. 475-481

Tognetti R., Johnson J.D. et Michelozzi M.

The response of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from two Italian populations to drought and recovery. Trees, 1995, vol. 9, n°6, pp. 348-354

Tsurunaga Y., Takahashi T., Katsube T., Kudo A., Kuramitsu O., Ishiwata M. et Matsumoto S.

Effects of UV-B irradiation on the levels of anthocyanin, rutin and radical scavenging activity of buckwheat sprouts. Food Chemistry, 2013, vol. 141, n°1, pp. 552-556

Tuomi J., Niemelä P., Haukioja E., Sirén S., et Neuvonen S.

Nutrient stress: an explanation for plant anti-herbivore responses to defoliation. Oecologia (Berlin), 1984, vol. 61, pp. 208-210

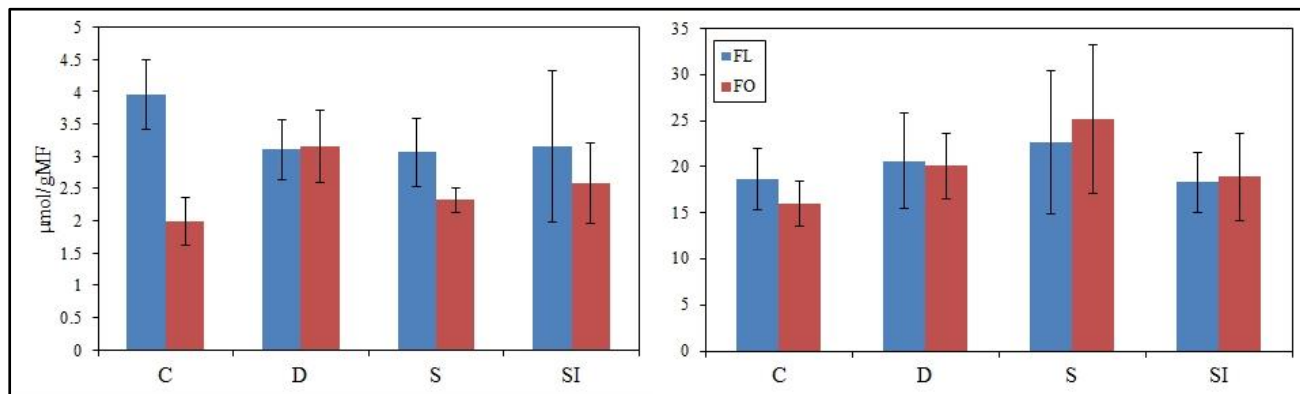
Tyree M.T. et Alexander J.D.

Plant water relations and the effects of elevated CO₂ : a review and suggestions for future research. Vegetatio, 1993, Vol. 104, n°1, pp. 47-62

Yamasaki H., Sakihama Y. et Ikehara N.

Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂, *Plant Physiology*, 1997, vol. 115, n°4, pp. 1405–1412

ANNEXE I



Autres exemples de profil FL/FO chez deux dérivés de l'acide cinnamique (phénylpropanoïdes) : l'isomère d'acide chlorogénique a (gauche) et l'isomère d'acide chlorogénique b (droite) (*Tableau II*). Leurs quantités sont exprimées en μmol équivalent acide chlorogénique/gMF. Ces données ne présentent pas de différences statistiquement significatives, elles servent ici d'illustration.

Résumé / Abstract

Cette étude vise à clarifier le rôle de métabolites secondaires dans la défense chez plusieurs populations de Hêtre soumises à un stress hydrique (modéré ou intense) ou une défoliation. Une approche quantitative, via des mesures de teneurs en flavonol au cours de la saison et des mesures biochimiques de teneur en phénols totaux, et une approche qualitative, via l'analyse du profil métabolique de onze phénols particuliers, ont été utilisées. Un niveau de composés phénoliques totaux significativement plus important a été observés sous sécheresse modéré et intense par rapport au contrôle. En outre, la faible disponibilité en carbone induite par le traitement défoliation semble avoir limité la capacité de synthèse de flavonols. Cette étude a mis en évidence la contribution des phénols dans la défense contre le stress oxydant dû à la sécheresse. Cette contribution nécessite cependant une forte disponibilité en ressources carbonées, celle-ci pouvant faire défaut lors de certains stress (défoliation, sécheresse intense). Finalement, l'acide coumaroylquinique, semble être un des acteurs majeurs de cette réponse du métabolisme secondaire aux stress.

This study aims at clarifying secondary metabolite contribution to plant cell defense in beech exposed to water stress or defoliation. Both quantitative, through flavonol content evolution across growth period and biochemical analysis of total phenol content, and qualitative approaches, through metabolic profil of eleven specific phenolic compounds, were used. A higher total phenol content was observed in drought treated trees compared to control. Furthermore, the lower carbon availability following defoliation treatment likely limits the flavonol biosynthesis capacity. This work supports the phenol contribution to defense against oxidative stress due to drought. This contribution however requires high carbon availability that can be restricted following defoliation or severe drought conditions. Finally, Coumaroylquinic acid seems to be one of the main actors of secondary metabolite response to stress.