AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
École Doctorale : Sciences et Ingénierie Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Département de Formation Doctorale : Biologie Forestière

Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université
Spécialité : Biologie Végétale et Forestière

présentée par

Matthieu BAGARD

Impact de l'ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (*Populus* x *canescens* [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire

Aspects écophysiologiques et cellulaires

Soutenue publiquement le 5 mars 2008 à Nancy devant la commission d'examen :

J.-P. BIOLLEY	Pr., Université de Poitiers	Rapporteur
D. LAFFRAY	Pr., Université de Paris 12	Rapporteur
P. GARDESTRÖM	Pr., UPSC Umeå	Examinateur
P. DIZENGREMEL	Pr., UHP Nancy-Université	Examinateur / Codirecteur de thèse
Y. JOLIVET	MC, UHP Nancy-Université	Examinateur / Directeur de thèse

Unité Mixte de Recherche 1137 INRA/UHP Écologie & Écophysiologie Forestières

Équipe d'Écophysiologie Cellulaire & Moléculaire

Faculté des Sciences et Techniques ; BP 239 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Après un paquet d'années passées à Nancy, mes remerciements vont à tous ceux, et ils sont nombreux, qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la rédaction de cette thèse. En vrac et en espérant n'oublier personne :

Mes premiers mots vont à Yves Jolivet, parce qu'il m'a confié ce sujet de thèse, parce qu'il m'a aidé depuis mes premiers pas pour le moins hésitants dans le labo jusqu'aux derniers jours de rédaction, parce qu'il a toujours fait preuve de patience et de compréhension. Merci Yves.

Je remercie Pierre Dizengremel qui m'a accueilli dans son équipe et trimballé dans ses valises aux quatre coins du monde pour vanter les bienfaits de l'ozone. Merci chef !

Merci à Marie-Paule Hasenfratz-Sauder, aussi méticuleuse dans l'organisation des prélèvements que dans la correction de mes productions écrites, ceinture noire de typographie !

Un grand merci à Didier Le Thiec pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter, depuis les mesures d'échanges gazeux jusqu'à la rédaction des manuscrits.

Je tiens aussi à remercier Daniel Laffray et Jean-Philippe Biolley d'avoir accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteurs

Merci à Per Gardeström qui, en plus de son accueil et de son aide lors de mes séjours à Umeå, a accepté de participer à mon jury de thèse.

Mes remerciements vont bien sûr à toute l'équipe du cinquième. Les tôliers tout d'abord : Jacques sans qui les chambres ne pourraient pas tourner, Joëlle pour ses précieux conseils de labo, Jean-Claude mon bien-aimé tuteur et râleur de haut niveau, Mireille que j'ai dû citer 412 fois dans ce mémoire, Dany le Serge July de la physio végétale, Elisabeth aussi discrète que souriante, Dominique avec qui travailler se révèle aussi agréable qu'enrichissant, Lysiane qui a dû lutter avec des dossiers de remboursement bancals, et Daniel enfin pour son cours de fluo express.

Merci aussi aux jeunots du 5 : Nico alias Ritch pour le voiturage, les repiquages et les discutages de foot et de cinoche, Anthony alias Mille-Feuilles pour les virées champêtres (tabernacle !), Julien parti patauger en zone inondable, Sylvain (fais nous signe, vieux !), Sacha pour tout ce boulot partagé et cette bonne surprise d'IF 6, et Emilien (on pourra dire qu'on a manqué de blé pour publier!). Pour faire un peu plus générique de péplum, j'ajoute les bleus du sixième, Caroline, Pierrick et Nicolas, que je connais encore peu mais apprécie déjà rudement.

Je ne peux pas ne pas remercier les stagiaires qui ont contribué à ce travail de thèse : Hélène qui n'a pas eu de bol avec la HPR, Jessica qui en a eu un peu plus avec la GS, Cindy qui doit chercher la PEPc des champis, Serge pour son chouette boulot sur les ROS (quand tu veux pour une revanche au basket !) et Benjamin avec qui on a plus cartonné en Tank qu'en RT-PCR.

J'en place une pour la sympathique troupe de Champenoux : Anny, Blandine, Aurélie, Julien, Pascal, Jeanne, Xavier, Rana (désolé pour ceux que j'oublie).

Merci à Nicolas Rouhier et Jean-Pierre Jacquot de m'avoir permis de terminer la rédaction dans de bonnes conditions, tout en me payant des coups avec régularité. C'est pas tout ça, j'ai des prots sur la planche maintenant.

À Umeå, je remercie Vaughan Hurry qui m'a accueilli dans son labo, Catherine Benedict pour la partie microarray, Manoj Kumar pour les extractions d'ARN, Andreas Sjödin qui m'a évité des semaines de galère sur l'UPSC-BASE, et en général tous les Français au bout du nez gelé.

À Esch-sur-Alzette, je remercie Jenny Renaut et Jean-François Hausman pour leur accueil lors de nos visites au centre Lippmann et les sessions de brainstorming précédant l'envoi de l'article.

Un merci tout spécial à tonton Olivier. Si je dois retenir une chose de mes séjours en Suède, ça sera ta rencontre. Quand tu veux pour bosser ensemble, grôs (et accessoirement boire des coups, refaire le monde et enchaîner des *take down*).

Et un autre merci tout aussi spécial à mes camarades de monitorat Manon et Julien. Vous me manquez !

Évidemment, je me dois de citer mes potes qui, si on est positif, m'ont permis de relâcher la pression pour mieux bosser, ou ont contribué à rendre les matins plus… difficiles, c'est selon. Heureusement que vous êtes là, bande de malins.

Merci à la Perette family pour tout le soutien et la gentillesse dont ils font preuve à mon égard. C'est bête à écrire, mais vous êtes vraiment des gens bien.

Je voudrais aussi remercier ma famille, et tout particulièrement mes grands-parents de Favières et de Bulligny que je ne vois pas assez. Et ma petite maman bien sûr, qui est toujours là pour moi. Quelques mots ne peuvent pas traduire toute ma gratitude pour toi, maman.

Un immense merci à Sabine, qui me supporte au sens propre comme au figuré. Je ne peux pas imaginer ce qu'aurait été cette dernière année sans toi, Bibi. Et encore moins celles à venir.

Je souhaite enfin dédier cette thèse à mon père qui devait pester contre les peupliers lorsqu'il y emmêlait sa ligne.

AVANT-PROPOS

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé sous la responsabilité d'Yves Jolivet dans l'équipe Écophysiologie Cellulaire et Moléculaire de l'UMR 1137 INRA/UHP Écologie et Écophysiologie Forestières à Vandoeuvre-lès-Nancy.

Une partie du travail a été menée au Centre INRA de Nancy sous la responsabilité de Didier Le Thiec dans l'équipe Bioclimatologie et Écophysiologie de l'UMR 1137 et à l'UPSC d'Umeå sous la responsabilité de Per Gardeström.

« Le jour se lève, j'irais bien danser

Avec les feuilles du peuplier »

***Les Rita Mitsouko* (Ding Dang Dong)**

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS ---------- 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ---------- 4

Introduction ---------- 4

I. La molécule d'ozone ---------- 5

I.1. Histoire scientifique et technique de l'ozone ---------- 5

I.2. Propriétés physico-chimiques de l'ozone ---------- 7

I.3. L'ozone dans l'atmosphère terrestre ---------- 8

I.3.1. Cycle de l'ozone dans la stratosphère ---------- 8

I.3.2. La couche d'ozone menacée ---------- 9

II. L'ozone troposphérique ---------- 9

II.1. Cycle de l'ozone dans la troposphère ---------- 10

II.2. Évolution de la concentration en ozone dans la troposphère ---------- 11

II.3. Conséquences de la pollution à l'ozone pour l'Homme ---------- 12

II.3.1. Altération de la fonction pulmonaire ---------- 13

II.3.2. Dommages tissulaires et réponse inflammatoire ---------- 13

II.3.3. Mécanismes de toxicité de l'ozone ---------- 14

II.3.4. Épidémiologie ---------- 14

II.3.5. Autres conséquences sur la santé ---------- 15

II.3.6. Seuils de risques d'exposition à l'ozone ---------- 15

III. Impact de l'ozone troposphérique sur la végétation ---------- 16

III.1. Impact sur les espèces cultivées ---------- 16

III.1.1. Dommages visibles ---------- 16

III.1.2. Croissance et rendement ---------- 16

III.1.3. Photosynthèse ---------- 17

III.1.4. Allocation des photosynthétats ---------- 17

III.1.5. Reproduction ---------- 18

III.1.6. Autres aspects agronomiques ---------- 18

III.1.7. Impact sur les agroécosystèmes ---------- 19

III.2. Impact sur les arbres forestiers ---------- 19

III.2.1. Symptômes visibles et croissance ---------- 19

III.2.2. Photosynthèse ---------- 20

III.2.3. Sénescence foliaire accélérée ---------- 21

III.2.4. Allocation de carbone aux racines ---- 22
III.2.5. Reproduction---- 22
III.2.6. Respiration mitochondriale---- 22
III.2.7. Métabolisme secondaire et système antioxydant ---- 23
III.2.8. Impact sur les écosystèmes forestiers---- 23
III.3. Indices et seuils critiques d'exposition à l'ozone---- 24

IV. Mécanismes d'action de l'ozone à l'échelle cellulaire ----26
IV.1. Diffusion dans les tissus foliaires---- 26
IV.2. Réactions dans l'apoplasme ---- 27
IV.3. Stress oxydatif cellulaire ---- 28
IV.4. Déclenchement de la mort cellulaire ---- 28
IV.5. Réponses cellulaires à une exposition chronique ---- 29

V. Interactions avec d'autres facteurs environnementaux----30
V.1. Augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique ---- 30
V.2. Sécheresse ---- 31
V.3. Dépôts azotés---- 31
V.4. Changement climatique global, ozone troposphérique et végétation ---- 33

PROBLÉMATIQUE ---- 34

I. Contexte scientifique local ----34

II. Contexte scientifique global ----34
II.1. Modèle biologique---- 34
II.2. Type d'exposition à l'ozone ---- 35
II.3. Stade de développement des arbres---- 36

III. Problématique scientifique ----36
III.1. Impact de l'ozone et développement foliaire ---- 36
III.2. Photorespiration---- 38
III.2.1. Description du cycle photorespiratoire ---- 38
III.2.2. Rôle de la photorespiration---- 39
III.2.3. Effets de l'ozone sur la photorespiration---- 40

MATÉRIEL & MÉTHODES---- 42

I. Matériel végétal et conditions de culture ----42

II. Fumigation à l'ozone----43
II.1. Description du dispositif---- 43
II.2. Procédure de fumigation---- 44

II.3. Indices d'exposition à l'ozone ---- 44

III. Méthodes ---- 46

III.1. Expériences répétées ---- 46

III.2. Développement foliaire et procédure de prélèvement ---- 46

III.2.1. Étages foliaires ---- 46

III.2.2. Prélèvements des feuilles ---- 46

III.2.3. Détermination de la surface foliaire ---- 47

III.3. Mesures de croissance et de biomasse ---- 47

III.4. Étude histologique ---- 48

III.4.1. Microscopie optique ---- 48

III.4.2. Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène ---- 48

III.5. Quantification de la teneur en chlorophylles totales ---- 49

III.6. Mesure des échanges gazeux foliaires ---- 50

III.6.1. Principe ---- 50

III.6.2. Mesures ---- 50

III.7. Courbes de réponse de la photosynthèse au CO_2 ---- 51

III.7.1. Principe et interprétation des courbes A/C_i ---- 51

III.7.2. Ajustement du modèle ---- 53

III.7.3. Mesures ---- 54

III.8. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne ---- 55

III.8.1. Principe ---- 55

III.8.2. Mesures ---- 57

III.8.3. Estimation de la photorespiration ---- 58

III.9. Analyses biochimiques ---- 59

III.9.1. Extraction et dosage des protéines solubles ---- 59

III.9.1.1. Extraction ---- 59

III.9.1.2. Filtration des extraits végétaux ---- 60

III.9.1.3. Quantification des protéines solubles ---- 60

III.9.2. Activités enzymatiques spécifiques ---- 60

III.9.2.1. Principe des mesures ---- 60

III.9.2.2. Rubisco, activité carboxylase totale (EC 4.1.1.39) ---- 61

III.9.2.3. Phosphoénolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) ---- 61

III.9.2.4. Hydroxypyruvate réductase (EC 1.1.1.29) ---- 62

III.9.2.5. Glycolate oxydase (EC 1.1.3.1.) ---- 62

III.9.2.6. Glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), activité transférasique ---- 63

III.9.2.7. Calcul des activités spécifiques ---- 64

III.9.3. Révélation sur geI de l'activité glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.) ---- 64

III.9.4. Immunodétection de la GDC H et de la SHMT ---- 65

III.9.4.1. Préparation des extraits protéiques dénaturés ---- 65

III.9.4.2. Séparation par SDS-PAGE et transfert sur membrane ---- 65

III.9.4.3. Immunodétection des protéines ---- 66
III.10. Traitement statistique ---- 66
III.10.1. Comparaison d'échantillons ---- 66
III.10.2. Relation linéaire ---- 67
III.10.3. Comparaison de pentes ---- 67

RÉSULTATS ---- 68

I. Fumigation ---- 68
I.1. Exposition journalière ---- 68
I.2. SUM00 et AOT40 ---- 69
I.3. Dose d'ozone cumulée (CUO) ---- 69

II. Symptômes associés à l'exposition à l'ozone ---- 69
II.1. Symptômes foliaires visibles ---- 69
II.2. Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène ---- 70

III. Croissance et biomasse ---- 71

IV. Développement foliaire ---- 71
IV.1. Détermination de la surface foliaire ---- 71
IV.2. Évolution de la surface foliaire ---- 72

V. Paramètres photosynthétiques ---- 73
V.1. Teneurs en chlorophylles totales ---- 73
V.2. Assimilation nette de CO_2 et conductance stomatique ---- 73
V.3. Courbes A/C_i et paramètres photosynthétiques dérivés ---- 74
V.4. Paramètres dérivés de la fluorescence chlorophyllienne ---- 75
V.5. Activité enzymatique des carboxylases rubisco et PEPc ---- 75
V.6. Réponse des paramètres photosynthétiques au CUO ---- 76

VI. Respiration mitochondriale ---- 76

VI. Photorespiration ---- 77
VI.1. Activité photorespiratoire in vivo ---- 77
VI.2. Activités enzymatiques photorespiratoires ---- 77
VI.2.1. Glycolate oxydase ---- 77
VI.2.2. Hydroxypyruvate réductase ---- 78
VI.3. Glutamine synthétase (GS) ---- 78
VI.3.1. Activité spécifique de la GS ---- 78
VI.3.2. Gels d'activité GS ---- 78
VI.4. Immunodétection de la GDC H et de la SHMT ---- 79

DISCUSSION ---------- 80

I. Effets de l'exposition à l'ozone à l'échelle de la plante entière ---------- 80

I.1. Exposition à l'ozone ---------- 80

I.2. Symptômes visibles ---------- 81

I.3. Impact sur la croissance ---------- 83

II. Impact sur le métabolisme primaire lors du développement foliaire ---------- 85

II.1. Développement foliaire ---------- 85

II.2. Réduction de la capacité photosynthétique des feuilles matures ---------- 87

II.2.1. Impact sur la fixation du CO_2 atmosphérique ---------- 87

II.2.2. Impact sur la photochimie ---------- 87

II.3. Évolution de la sensibilité à l'ozone au cours du développement foliaire ---------- 88

II.3.1. Résistance des feuilles en phase précoce de développement ---------- 88

II.3.2. Réponse différentielle au CUO ---------- 90

II.3.3. Perte de la résistance à l'ozone et transition *puits/source* ---------- 90

II.3.4. Sénescence accélérée des feuilles matures ---------- 91

II.4. Réponses cellulaires et métaboliques à l'exposition à l'ozone ---------- 92

II.4.1. Réponse stomatique ---------- 92

II.4.2. Stimulation des processus cataboliques ---------- 93

II.4.3. Conséquences métaboliques de la stimulation de la PEPc ---------- 93

III. Photorespiration ---------- 96

III.1. Activité photorespiratoire et enzymes associées ---------- 96

III.2. Réponse du couple GDC/SHMT et implications possibles ---------- 97

III.3. Réponse de la glutamine synthétase et implications possibles ---------- 99

CONCLUSION & PERSPECTIVES ---------- 101

RÉFÉRENCES ---------- 105

ANNEXE 1 ---------- 119

Analyse protéomique ---------- 119

ANNEXE 2 ---------- 136

Analyse transcriptionnelle ---------- 136

ANNEXE 3 ---------- 143

Index des espèces végétales citées ---------- 143

ANNEXE 4 ---------- 145

Liste des publications ---------- 145

ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

A	Assimilation nette de CO_2
A_{sat}	Assimilation nette de CO_2 en conditions d'intensité lumineuse saturante
ADNc	Séquences d'ADN complémentaire des ARN messagers
ADP	Adénosine diphosphate
APMSF	(4-aminodinophényl)méthane sulfonyl-fluoride
APX	Ascorbate peroxydase
AOA	Acide oxaloacétique
AOT40	*Accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb*
	(moyennes horaires cumulées de concentration en ozone au-dessus de 40 ppb)
ATP	Adénosine triphosphate
Bicine	N,N–bis (2-hydroxyéthyl)-glycine
C1	Composés à un carbone (et métabolisme du même nom)
c_a, c_i, c_c	Concentrations atmosphérique, interne et chloroplastique en CO_2 (en ppm)
C_a, C_i, C_c	Pressions partielle atmosphérique, interne et chloroplastique en CO_2 (en Pa)
CAD	Cinnamyl alcool déshydrogénase
CCI	*Chlorophyll content index* (indice de teneur en chlorophylles totales)
CF-air	*Charcoal-filtered air* (air filtré sur charbon actif)
CFC	Chlorofluorocarbones
CHISAM	Chloroforme : isoamylalcool
Chl	Teneur en chlorophylles totales
Chl a, Chl b	Chlorophylle a, Chlorophylle b
CP	Créatine phosphate
CPK	Créatine phosphokinase
COV	Composés organiques volatils
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
CUO	*Cumulative uptake of ozone* (flux stomatique cumulé d'ozone)
Cy3, Cy5	Cyanine 3, Cyanine 5
DAB	3,3'-diaminobenzine tétrahydrochloride
DEPC	Pyrocarbonate de diéthyle
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
ε	Coefficient d'extinction molaire
EDTA	Acide éthylène bis(b-aminoéthyléther)N,N,N',N'-tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(b-aminoéthyléther)N,N,N',N'-tétraacétique
EST	*Expressed sequence tag* (marqueur de séquence transcrite)
F_{O_3}	Flux stomatique d'ozone
FACE	*Free-Air CO_2 Enrichment* (système de fumigation à l'air libre)

FE	Feuilles en expansion
FEV_1	*Forced expiratory volume in one second* (volume expiratoire maximal par seconde)
FJ	Feuilles jeunes
FM	Feuilles matures
FMN	Flavine mononucléotide
F_v/F_m	Rendement quantique maximal du photosystème II
FVC	*Forced expiratory vital capacity* (capacité vitale forcée)
g_m	Conductance du mésophylle pour le CO_2
g_{O3}	Conductance stomatique pour l'ozone
g_s	Conductance stomatique pour la vapeur d'eau
G6P	Glucose 6-phosphate
Gal-3-P	Glyceraldéhyde 3-phosphate
Gal-3-PDH	Glyceraldéhyde 3-phosphodeshydrogénase
GDC	Glycine décarboxylase
GO	Glycolate oxydase
GS	Glutamine synthétase
HEPES	N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N-(2-éthane sulfonate)
HP	Humidité pondérale
HPR	Hydroxypyruvate réductase
IgG	Immunoglobuline G
IC	*Inspiratory capacity* (capacité inspiratoire)
*J*max	Densité maximale du flux d'électrons photosynthétiques
λ	Longueur d'onde
MDH	Malate déshydrogénase
MF	Masse de matière fraîche
MS	Masse de matière sèche
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
NO	Monoxyde d'azote
NO_x	Oxydes d'azote
O_3	Ozone
OTC	*Open-top chambers* (chambres de fumigation à ciel ouvert)
Φ_{PSII}	Rendement quantique du photosystème II
P_i	Phosphate inorganique
P_r	Activité photorespiratoire *in vivo*
PCR	*Polymerase chain reaction* (amplification en chaîne par polymérase)
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPc	Phosphoénolpyruvate carboxylase
3-PGK	3-Phosphoglycérate kinase
ppb	Parties par milliards, en volume

PPFD	*Photosynthetic photon flux density* (densité de flux de photons photosynthétiques)
ppm	Parties par millions, en volume
PS I, II	Photosystèmes I et II
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
qP	*Quenching* photochimique
R_d	Respiration mitochondriale de tissus illuminés
R_n	Respiration mitochondriale de tissus à l'obscurité
RGR	*Relative growth rate* (taux de croissance relative)
ROS	*Reactive oxygen species* (espèces oxygénées réactives)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
RuBP	Ribulose bisphosphate
SAB	Sérum albumine bovine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Sodium dodécylsulfate *polyacrylamide gel electrophoresis* (électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes)
SHMT	Sérine hydroxyméthyl transférase
SLA	*Specific Leaf Area* (surface foliaire spécifique, en $cm^2.g_{MS}^{-1}$)
SSC	Solution de dodécylsulfate de sodium, NaCl et citrate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
SUM00	Moyennes horaires cumulées de concentration en ozone
TAE	Tampon Tris/Acétate/EDTA
TCA	Acide trichloroacétique
TLC	*Total lung capacity* (capacité pulmonaire totale)
TPU	Utilisation des trioses-phosphate
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
Tween 20	Polyoxyéthylènesorbitane monolaurate
UV	Ultraviolet
V_{cmax}	Vitesse maximale de carboxylation du RuBP par la rubisco

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'impact des sociétés humaines sur leur environnement s'est amplifié de manière considérable depuis le début de l'ère industrielle. Si les activités humaines affectent directement les écosystèmes par le biais d'une gestion immodérée des ressources et d'une pollution chronique de l'air, de l'eau et de la terre, de nombreux indices montrent que l'Homme est également responsable d'un dérèglement climatique global. L'augmentation de la concentration troposphérique en ozone, qui constitue à la fois un polluant oxydant toxique et un gaz à effet de serre, est une composante majeure de la pollution atmosphérique d'origine anthropique. L'impact de l'ozone sur la végétation en fait d'ailleurs le premier polluant atmosphérique en termes de phytotoxicité. Le travail expérimental présenté dans ce mémoire a consisté à étudier les effets d'une exposition prolongée à une concentration en ozone relativement élevée sur de jeunes plants de peuplier cultivés et traités en chambres phytotroniques. La synthèse bibliographique qui constitue la première partie du mémoire présente l'histoire scientifique et les propriétés de la molécule d'ozone ainsi que sa répartition et les mécanismes de sa formation dans l'atmosphère terrestre. Après avoir abordé les conséquences de la pollution à l'ozone pour la santé humaine, nous développerons les effets de l'ozone sur les plantes cultivées et les arbres forestiers, en s'attardant sur les mécanismes d'action du polluant à l'échelle cellulaire. Nous nous intéresserons enfin aux interactions avec d'autres facteurs environnementaux tels que le fort CO2, la sécheresse et les dépôts azotés. Cette synthèse bibliographique sera suivie de la présentation de la problématique qui a dirigé notre démarche et de la description du matériel biologique et des méthodes expérimentales qui ont été employés. Les résultats de notre étude seront ensuite commentés puis discutés, et nous aborderons en conclusion les perspectives de recherche offertes par notre travail.

I. La molécule d'ozone

I.1. Histoire scientifique et technique de l'ozone

3000 av. J.C. : Dans *l'Iliade et l'Odyssée*, Homère décrit la colère de Zeus, projetant des éclairs qui remplissent l'air d'une forte odeur de soufre. Homère évoque sans doute ici l'expérience d'un violent orage et de l'odeur qui accompagne la foudre, issue non pas du soufre mais de l'ozone formé par la dissociation du dioxygène lors du passage de la décharge électrique dans l'air. Ce récit pourrait donc constituer le premier témoignage de l'observation de la présence d'ozone dans l'atmosphère terrestre (Rowland 2006).

1840 : Le chimiste allemand Christian Friedrich Schönbein émet l'hypothèse que l'odeur qui suit la foudre, celle qui accompagne l'électrolyse de l'eau et celle qu'il sent dans son laboratoire de l'université de Bâle en Suisse où il conduit des expériences sur l'électricité, proviennent d'une seule et même substance (Rubin 2001). Schönbein donne à cette substance le nom d'*ozone*, de la racine grecque *ozein* qui signifie *exhaler une odeur*.

1857 : L'industriel allemand Werner von Siemens met au point un procédé pour produire l'ozone à grande échelle de manière simple et fiable. Cette méthode, qui consiste à faire passer de l'air à travers une décharge électrique entre 2 électrodes, est encore utilisée aujourd'hui.

1865 : Le chimiste français Charles Soret détermine la formule de la molécule d'ozone (O_3).

1889 : Alfred Cornu, un astronome français, met en évidence l'absorption du rayonnement UV dans l'atmosphère.

1890 : Le chimiste allemand Ohlmüller découvre les propriétés bactéricides de l'ozone, ouvrant la voie à son utilisation dans le traitement de l'eau.

1891 : Walter Noel Hartley, physicien irlandais, s'appuie sur les travaux de Cornu et attribue à l'ozone l'absorption du rayonnement solaire ultraviolet dans l'atmosphère terrestre.

1893 : Première application commerciale de l'ozone au traitement de l'eau au Pays-Bas. On comptera une cinquantaine d'installations du même type en Europe à la veille de la première guerre mondiale.

1913 : Le physicien français Charles Fabry démontre de façon expérimentale l'existence de la couche d'ozone dans la stratosphère.

1915 : Le chlore, utilisé massivement comme gaz de combat pendant la première guerre mondiale, supplante l'ozone pour le traitement de l'eau.

1920 : Conception par le physicien et météorologue britannique Gordon Dobson du spectrophotomètre qui porte son nom. Cet appareil, qui permet de tracer le profil de distribution vertical de l'ozone, est encore aujourd'hui l'instrument essentiel pour la mesure de la quantité d'ozone dans l'atmosphère.

1930 : Sydney Chapman, astronome et géophysicien britannique, décrit la chimie de l'ozone dans la stratosphère (Chapman 1930).

1940 : Mise en évidence de la participation de l'ozone à la pollution photochimique (*smog*) dans la région de Los Angeles. L'ozone est maintenant considéré en tant que polluant toxique, et ses effets potentiels sur la santé humaine et la végétation sont envisagés.

1950 : Middleton décrit les dommages visibles sur la végétation provoqués par la pollution photochimique (Middleton *et al.* 1950). Dans les années qui suivent, les effets sur la végétation de la pollution à l'ozone en particulier seront identifiés (Haagen-Smit *et al.* 1952).

1953 : Les travaux du chimiste allemand Rudolf Criegee enrichissent considérablement les connaissances dans le domaine de la chimie de l'ozone.

1957 : Pour la première fois, des effets négatifs directs de l'ozone sur la santé humaine sont démontrés (Kleinfeld *et al.* 1957). Depuis lors, ses conséquences néfastes sur la santé, et en particulier sur la fonction pulmonaire, ont été largement étudiées.

1970 : Crutzen, puis Molina et Rowland décrivent la participation des oxydes d'azote (Crutzen 1970) et des composés halogénés (Molina & Rowland 1974) dans la chimie de l'ozone dans la stratosphère. Ces travaux leur vaudront le prix Nobel de chimie en 1995.

1985 : Des chercheurs britanniques en poste dans une station en Antarctique observent la disparition périodique de la couche d'ozone au dessus de ce continent (Farman *et al.* 1985). Le trerme de *trou dans la couche d'ozone* est évoqué pour la première fois.

1987 : Signature du *protocole de Montréal* visant à réduire de façon drastique les émissions de CFC. Il s'agit de l'un des très rares cas de l'histoire humaine où la communauté scientifique réussit à infléchir les décideurs politiques, contre l'influence de puissants lobbies économiques.

2003 : Parution du 3ème rapport du GIEC (Groupe intergouvernemental d'experts sur l'évolution du climat). La contribution de l'ozone troposphérique au forçage radiatif en fait le troisième gaz à effet de serre (IPCC 2001).
La France connaît un des étés les plus chauds de son histoire. Des épisodes de fortes concentrations en ozone s'ajoutent à une sécheresse prolongée. La durée de ces épisodes et l'étendue des régions concernées atteignent un niveau rarement atteint.

2007… : Parution du 4ème rapport du GIEC (IPCC 2007).

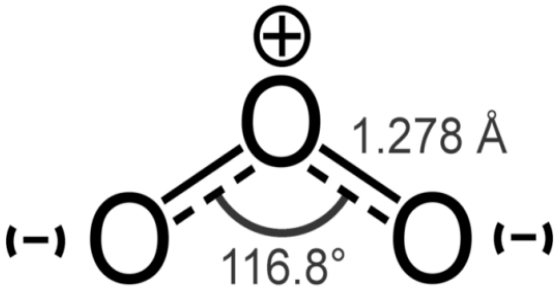


Figure 1 : Représentation schématique de la molécule d'ozone.

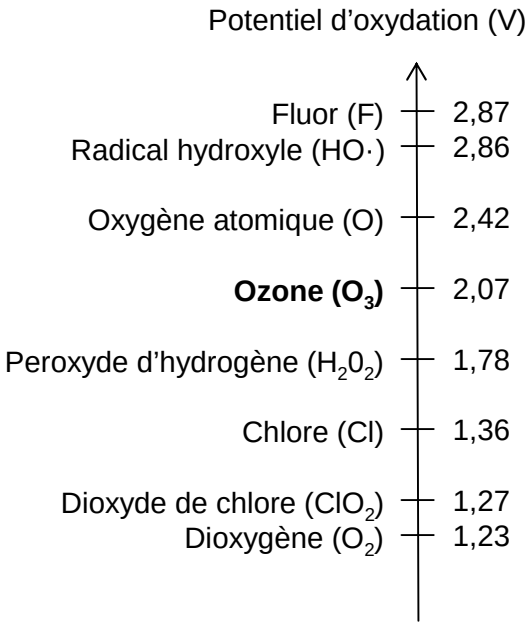


Figure 2 : Potentiels d'oxydation de divers composés oxydants

L'arrêt presque total des émissions de CFC a contribué à stopper la dégradation de l'ozone stratosphérique. La régénération de la couche d'ozone est en bonne voie mais semble toutefois plus lente que prévue, et le *trou* apparaît encore régulièrement au dessus de l'Antarctique.
Les émissions sans cesse croissantes des précurseurs de l'ozone troposphérique entraînent une hausse constante de sa concentration moyenne. L'ozone troposphérique est aujourd'hui, à l'échelle mondiale, un polluant photochimique majeur.

I.2. Propriétés physico-chimiques de l'ozone

L'ozone (O_3) est une variété allotropique de l'oxygène. A température ambiante, ce composé se présente sous la forme d'un gaz incolore qui dégage à partir de 8 à 36 ppb une odeur piquante caractéristique. Ses trois atomes d'oxygène disposés en triangle isocèle forment un hybride de résonance entre quatre formes mésomères (figure 1). La molécule d'ozone est très électrophile et affiche un potentiel d'oxydation élevé de 2,076 V (figure 2). L'ozone présente une solubilité limitée en milieu aqueux et s'y décompose pour former des radicaux libres, radical hydroxyle ($HO^{\cdot}$), ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), radical hydroperoxyle ($HO_2\cdot$) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (von Gunten 2007). De manière générale, la réactivité de l'ozone peut s'exercer sur de nombreuses molécules selon quatre modalités (Glaze 1986, Cacace & Speranza 1994):

- cycloaddition (mécanisme de Criegee)

Cette réaction intervient au niveau des liaisons insaturées et des liaisons carbone-hydrogène et concerne une large gamme de composés : alcools, éthers, aldéhydes, amines, alcanes et cycloalcanes.

- attaque électrophile

L'attaque électrophile a lieu au niveau des liaisons insaturées des molécules à forte densité électronique, tels que les composés aromatiques et les alcènes.

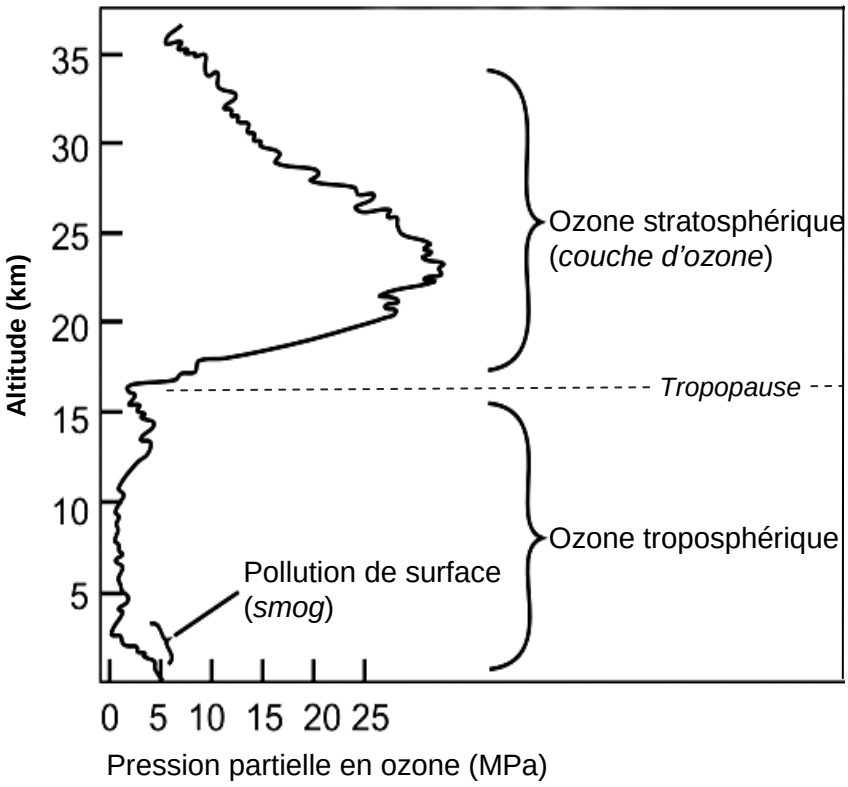
- auto-oxydation

Ce type de réaction permet l'oxydation de liaisons carbone-hydrogène via une réaction radicalaire en chaîne initiée par l'ozone et dont l'oxygène est l'oxydant.

- attaque nucléophile

Cette réaction est due à la présence d'un doublet d'électrons non partagé et permet l'oxydation de composés présentant un déficit électronique.

Bien que l'ozone ne soit à proprement parler ni une espèce radicalaire ni une espèce oxygénée réactive, il est capable de réagir avec la plupart des molécules des systèmes biologiques : glucides, protéines, lipides et acides nucléiques (Pryor 1994).



-90% de l'ozone atmosphérique
-Absorption des UV-B
-Tendance actuelle :
• diminution globale à long terme
• disparition locale périodique
(trou au dessus de l'Antarctique)

-10% de l'ozone atmosphérique.
-Polluant photochimique secondaire toxique pour l'Homme et la végétation
-Tendance actuelle :
• augmentation globale à long terme
• épisodes de pollution aiguë

Figure 3 : Distribution de l'ozone dans l'atmosphère terrestre.
Source : NASA - Earth Observing System (EOS) Science Plan.

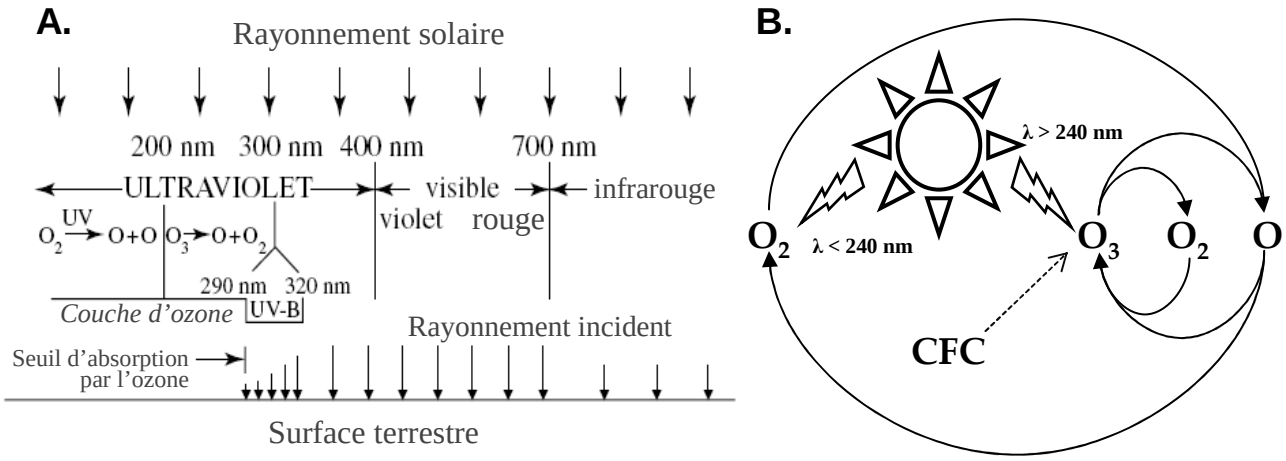


Figure 4 : **A.** Rôle de l'ozone dans l'absorption du rayonnement solaire dans l'atmosphère. **B.** Cycle simplifié de l'ozone dans la stratosphère. Intervention du rayonnement solaire et des composés chlorofluorocarbonés (CFC).

D'après Rowland (2006) *Phil. Trans. R. Soc. B.,* **361** : 769–790.

Les propriétés de la molécule d'ozone en font un oxydant et un désinfectant puissant. Généré de manière artificielle, il est utilisé dans divers procédés industriels : purification de l'eau potable, traitement des eaux usées, traitement des odeurs dans l'air, blanchisserie, test de vieillissement des matières plastiques, etc. (Kim *et al.* 2003, von Gunten 2007). Le principal avantage de l'ozone est son absence de rémanence dans les produits traités.

L'ozone présente par ailleurs des capacités d'absorption de la lumière dont les implications pour la chimie de l'atmosphère sont considérables. D'une part, l'ozone absorbe le rayonnement UV-B, ce qui permet à la couche d'ozone stratosphérique d'empêcher ces rayons nocifs d'atteindre la surface terrestre (Hollosy 2002). La chaleur produite par cette absorption permet de plus de maintenir la structure de la stratosphère (Rowland 2006). D'autre part, l'ozone troposphérique absorbe le rayonnement infrarouge et constitue de ce fait un gaz à effet de serre contribuant de manière importante au forçage radiatif (IPCC 2001).

I.3. L'ozone dans l'atmosphère terrestre

I.3.1. Cycle de l'ozone dans la stratosphère

L'ozone est un constituant minoritaire de l'atmosphère terrestre, représentant de 0 à 0,07 ppm (parties par millions en volume) selon l'altitude. Contrairement à la teneur de la plupart des constituants atmosphériques tels que le dioxygène ou l'azote, la teneur atmosphérique en ozone ne décroît pas de façon régulière avec l'altitude mais est maximale au niveau de la stratosphère, dans les couches situées entre 20 et 30 km d'altitude (figure 3). Cette fraction stratosphérique, qui concentre 90 % de l'ozone atmosphérique, est communément appelée *couche d'ozone*. La chimie de l'ozone dans la stratosphère forme un cycle décrit en 1930 par Chapman (figure 4B) (Rowland 2006). Le rayonnement solaire ultraviolet décompose les molécules de dioxygène en atomes d'oxygène qui réagissent avec d'autres molécules de dioxygène pour former des molécules d'ozone (O_3). L'ozone peut à son tour être décomposé par le rayonnement UV en dioxygène, ce qui instaure un équilibre dynamique entre formation et destruction de l'ozone. Lorsqu'ils pénètrent dans l'atmosphère terrestre, les rayons UV d'une longueur d'onde inférieure à 200 nm (UV-C) sont absorbés dans la ionosphère et la mésosphère (au-dessus de 50 km d'altitude) par le diazote (N_2), les atomes d'oxygène et le dioxygène (figure 4A). Les rayons UV de moindre énergie dont la longueur d'onde est comprise entre 200 et 320 nm (UV-B) sont ensuite absorbés dans la stratosphère par l'ozone. Au final, seuls les rayons UV d'énergie plus faible, dont la longueur d'onde est supérieure à 320 nm (UV-A), atteignent la surface terrestre. En absorbant les rayons UV-B, la couche d'ozone, formée 600 à 2000 millions d'années avant l'apparition de l'homme, a permis l'établissement de la vie à la surface de la Terre et protège la biosphère de leurs effets nocifs (Jankowski & Cader 1997, Hollosy 2002). De

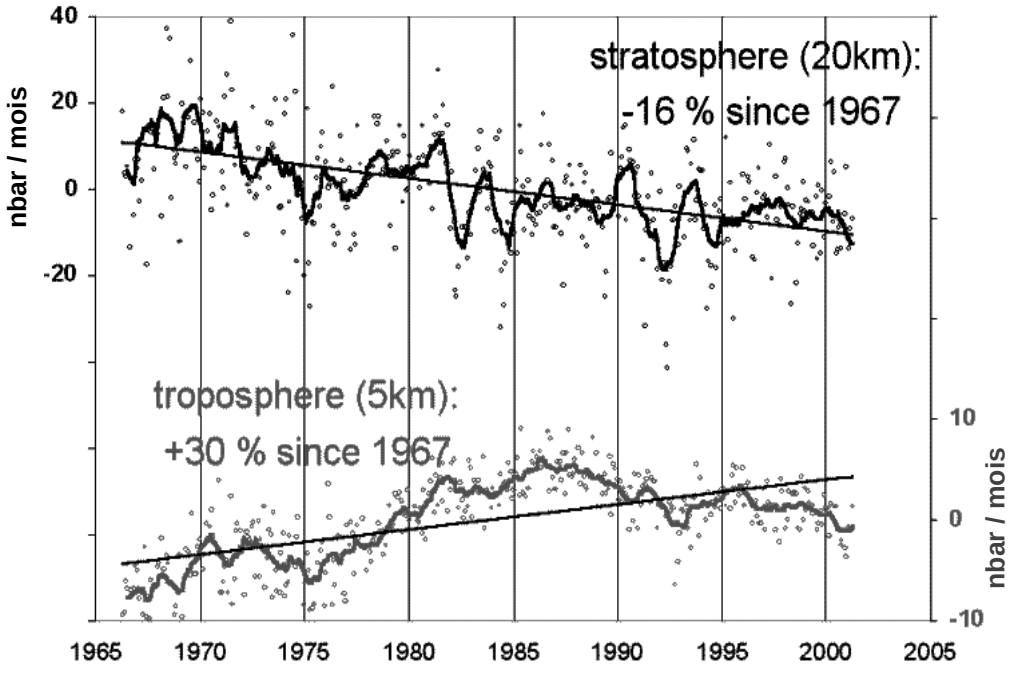


Figure 5 : Variation mensuelle de la pression partielle en ozone à 5 et 20 km d'altitude au dessus de l'observatoire du Hohenpeissenberg (Allemagne).

Source : Max Planck Institute for Chemistry, Atmospheric Chemistry Department. (http://www.atmosphere.mpg.de)

plus, la chaleur dégagée par l'absorption des UV par l'ozone permet de maintenir la structure même de la stratosphère (Rowland 2006).

I.3.2. La couche d'ozone menacée

Les travaux menés à partir des années 1970 par Crutzen, Molina et Rowland ont permis de mettre en évidence la participation des oxydes d'azote (NO_x) et de certains composés halogénés, contenant du chlore, du fluor, de l'iode ou du brome, dans la chimie de l'ozone (Crutzen 1970, Molina & Rowland 1974). Ces travaux, qui ont valu à leurs auteurs le prix Nobel de chimie en 1995, ont notamment permis de comprendre de quelle manière la hausse considérable des émissions anthropiques de composés halogénés, dont les chlorofluorocarbures (CFC), a perturbé le fragile équilibre dynamique entre formation et destruction de l'ozone dans la stratosphère (Bianco & Hynes 2006). La formation naturelle de l'ozone ne compensant plus sa destruction accrue sous l'effet des composés halogénés, une diminution de la concentration en ozone dans la stratosphère est apparue dans les années 1980 (figure 5) (Rowland 2006). La manifestation la plus significative de ce phénomène est la disparition périodique quasi-totale de la couche d'ozone au dessus de l'Antarctique, plus connue sous le terme de *trou dans la couche d'ozone* (Farman *et al.* 1985). En 2006, les habitants de la ville d'Ushuaia, à l'extrême sud de l'Argentine, ont ainsi été contraints de ne pas sortir découverts pour éviter de graves brûlures dues aux rayons UV (NSF 2007). Les mesures mises en place dans le cadre du protocole de Montréal, signé en 1987 sous l'égide de l'ONU, ont permis de réduire significativement les émissions de CFC (Rowland 2006), si bien que la couche d'ozone devrait retrouver l'état qui é it le sien en 1980 entre 2055 et 2065 (WMO 2003). Pour autant, ce problème reste d'actualité puisqu'un certain nombre d'études indique que la couche d'ozone se régénère moins vite que prévu (Weatherhead & Andersen 2006).

II. L'ozone troposphérique

L'ozone présente cette particularité d'être, vis-à-vis de la biosphère, à la fois essentiel et néfaste. Alors que la couche d'ozone stratosphérique protège la biosphère de la nocivité du rayonnement ultraviolet, l'ozone présent dans les couches basses de l'atmosphère est un polluant photochimique secondaire toxique dont la teneur augmente année après année (figure 5).

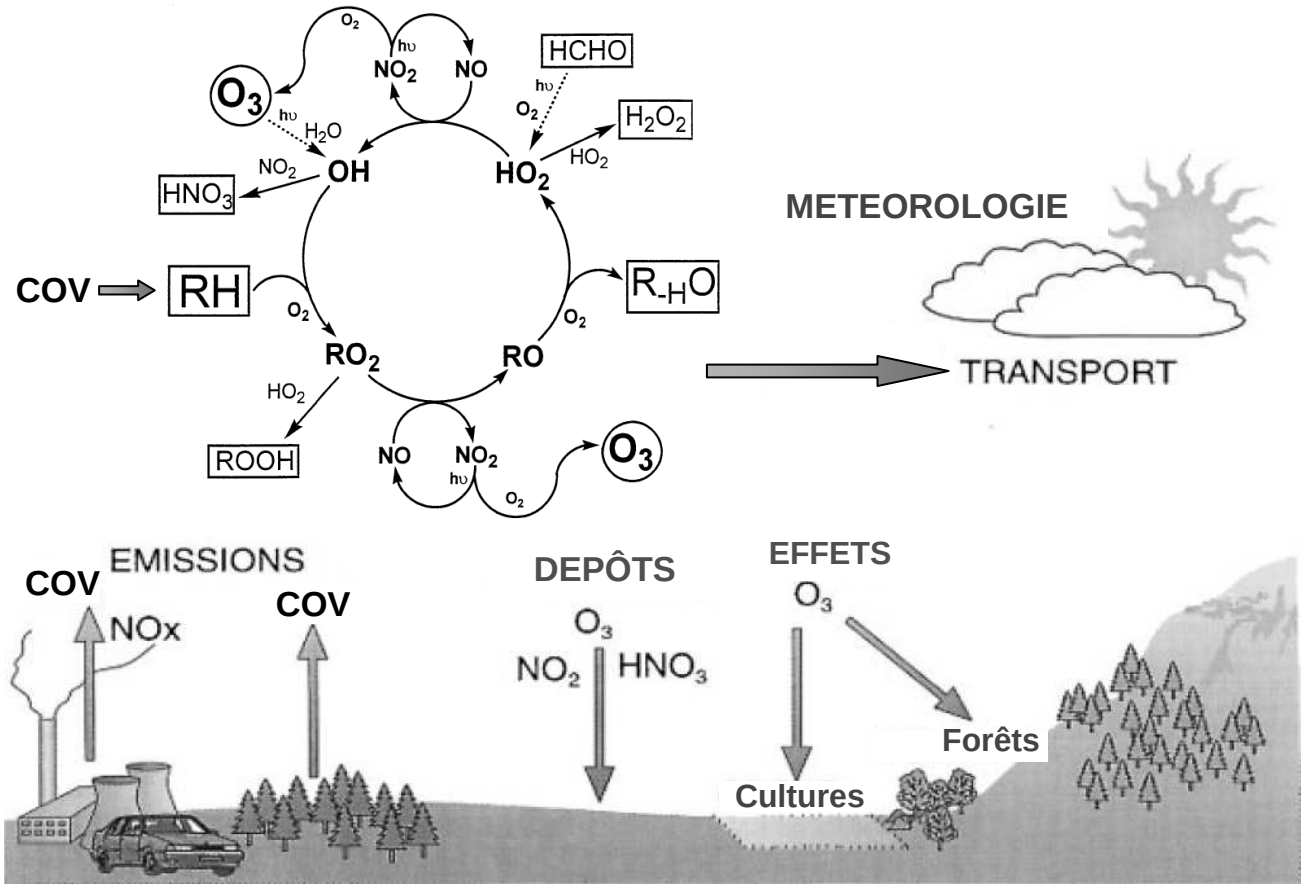
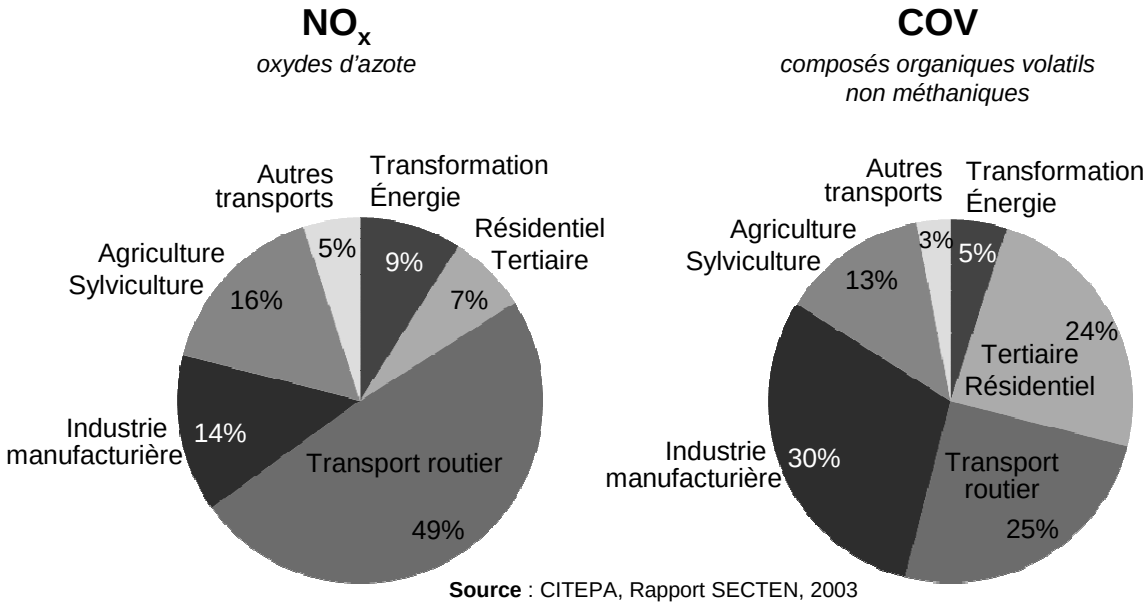


Figure 6 : Cycle de l'ozone troposphérique.

D'après Jenkin & Clemitshaw (2000) *Atmospheric Environment* , **34** : 2499-2527.



Source : CITEPA, Rapport SECTEN, 2003

Figure 7 : Répartition des émissions d'oxydes d'azote et de composés organiques volatils par secteur d'activité en France métropolitaine en 2001

II.1. Cycle de l'ozone dans la troposphère

La troposphère, constituée des couches basses de l'atmosphère terrestre, s'étend de la surface du sol jusqu'à la tropopause, qui marque la limite à partir de laquelle la température cesse de diminuer avec l'altitude (figure 3). L'épaisseur de la troposphère varie entre 13 et 16 km à l'équateur, et entre 7 et 8 km aux pôles. La troposphère, siège des phénomènes météorologiques et des flux atmosphériques, concentre la majeure partie de la masse d'air totale ainsi que la quasi-totalité de la vapeur d'eau, mais ne contient que 10 % de l'ozone atmosphérique. Les échanges verticaux entre stratosphère et troposphère contribuent de manière marginale à l'apport d'ozone dans la troposphère, dont la source principale est sa formation via une série de réactions photochimiques (figure 6) (Jenkin & Clemitshaw 2000).

En faisant abstraction de l'intervention des composés issus des activités humaines, l'ozone peut se former dans la troposphère de la même manière que dans la stratosphère, à partir de la dissociation de molécules de dioxygène sous l'effet de rayons UV. Cette réaction est limitée par l'intensité relativement faible du rayonnement UV au niveau de la troposphère et l'ozone produit reforme assez vite du dioxygène. Seule l'intervention de composés organiques volatils émis par la végétation terrestre peut favoriser une accumulation *naturelle* limitée d'ozone (Lee & Wang 2006). Le développement de l'industrie et des transports a considérablement modifié le cycle de l'ozone troposphérique. Les activités humaines produisent une grande quantité d'oxydes d'azote (figure 7) (Lee *et al.* 1997) qui, sous l'effet du rayonnement UV, peuvent libérer de l'oxygène. Les atomes d'oxygène se combinent au dioxygène de l'air pour former de l'ozone qui réagit avec le monoxyde d'azote, ce qui limite son accumulation (Jenkin & Clemitshaw 2000).

$$2\ NO + O_2 \rightarrow 2\ NO_2 \quad (1)$$

$$NO_2 + h\nu \rightarrow NO + O \quad (2)$$

$$O + O_2 \rightarrow O_3 \quad (3)$$

$$O_3 + NO \rightarrow O_2 + NO_2 \quad (4)$$

En théorie, la teneur en ozone dans la troposphère devrait résulter d'un équilibre photochimique déterminé par le rapport entre NO et NO_2 et l'intensité du rayonnement solaire, mais les teneurs mesurées dans la troposphère dépassent les valeurs prédites par ce modèle simple. En atmosphère polluée, de nombreux composés interviennent dans le cycle de formation de l'ozone troposphérique (Jenkin & Clemitshaw 2000). Ces composés sont principalement des hydrocarbures en phase gazeuse, regroupés sous le terme de composés organiques volatils (COV). En se combinant préférentiellement avec le monoxyde d'azote, ces composés rendent possible l'accumulation de l'ozone (figure 6). De plus, ils représentent une source de NO_2 non issu de la dégradation de l'ozone, ce qui déséquilibre davantage le système en faveur de la formation d'ozone. Les émissions directes d'ozone, naturelles ou anthropiques, sont

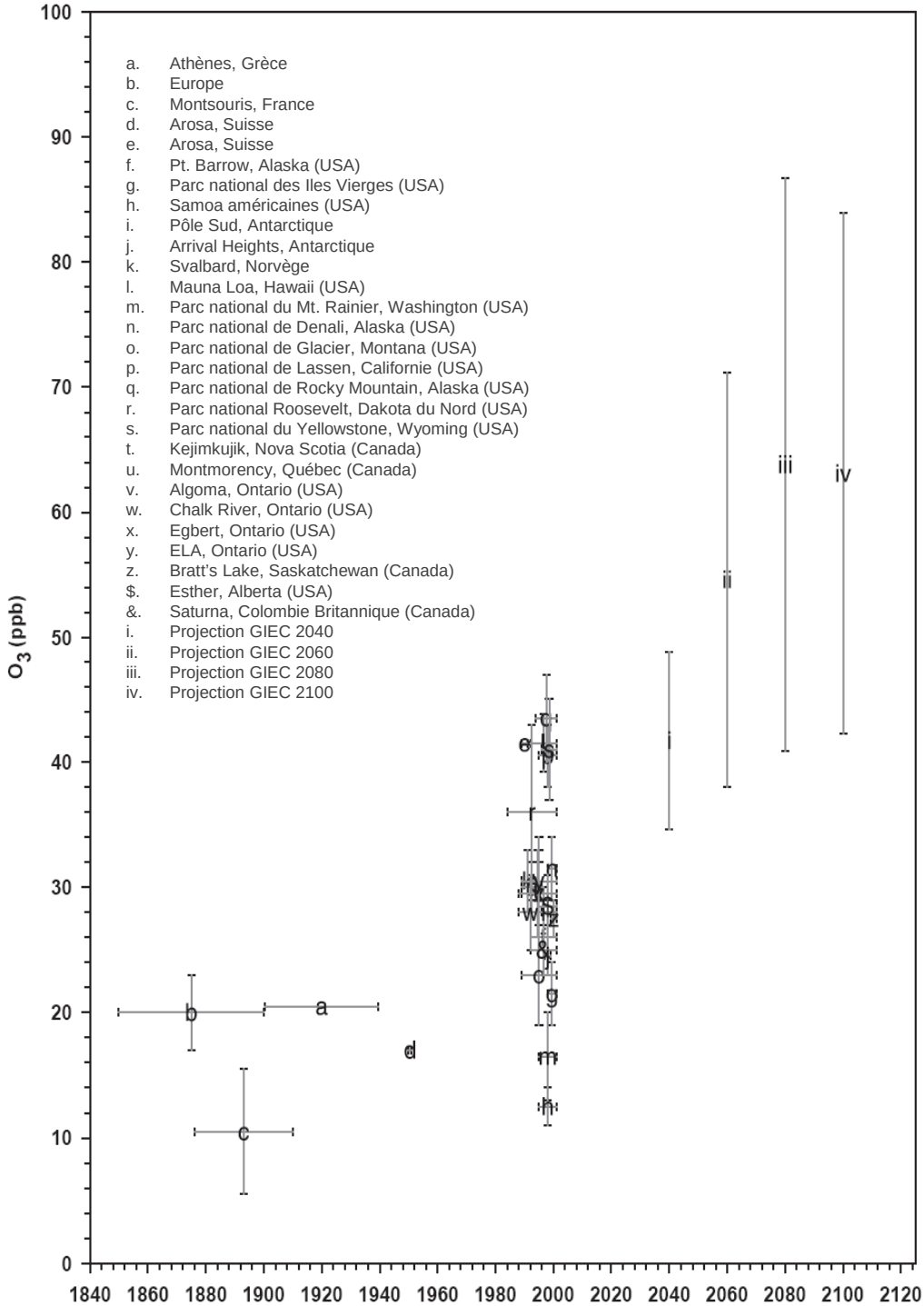


Figure 8 : Évolution de la concentration troposphérique en ozone de 1840 à 2100. Les symboles représentent des valeurs historiques (a, b, c, d), des mesures récentes (e à &) et des projections du GIEC (i, ii, iii, iv). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-type indiqués dans les publications sources.

D'après Vingarzan (2004) *Atmospheric Environment*, **38** : 3431-3442.

pratiquement nulles. La formation de l'ozone dans la troposphère est donc associée à la présence de précurseurs chimiques, oxydes d'azote et COV, ce qui fait de l'ozone un polluant secondaire. Formé sous l'action du rayonnement solaire, il est en outre qualifié de polluant photochimique.

Les principales conditions favorisant l'apparition de pics d'ozone sont (i) l'ensoleillement, puisque le rayonnement UV est directement à l'origine de la formation d'ozone, (ii) la circulation automobile, forte productrice de ses précurseurs chimiques (NO et COV), (iii) l'absence de vent, qui empêche la dispersion des polluants primaires et secondaires. D'autres facteurs interviennent également, parmi lesquelles l'activité industrielle, productrice de COV, ou la température de l'air, avec laquelle augmente la volatilité des COV.

En zones urbaines, la concentration importante en monoxyde d'azote permet d'éliminer efficacement l'ozone formé (Sillman 1999). Cette réaction intervient surtout la nuit en l'absence de formation d'ozone, mais peut aussi se produire le jour lorsque la concentration en NO est forte et celle en COV faible. Cette situation se produit notamment de manière régulière en début de matinée. A ce moment, la circulation automobile, productrice de NO, est intense et la température de l'air encore peu élevée, ce qui limite la volatilité des COV. En zones urbaines, la concentration en ozone suit donc un rythme diurne et est maximale en milieu d'après-midi. En zones suburbaines et rurales, la teneur plus faible en NO ne permet pas d'éliminer complètement l'ozone. Par conséquent, la concentration en ozone n'y décroît généralement pas la nuit (Sillman 1999). De plus, les émissions de COV par les couverts forestiers s'ajoutent à celles issues de l'industrie (Guenther *et al.* 1995). On peut ainsi observer des concentrations élevées en ozone dans certaines zones rurales assez éloignées des grands centres urbains et industriels (Sillman 1999). Les vents jouent ici un rôle important en véhiculant les polluants primaires et secondaires depuis leur zone de production jusqu'à des zones rurales éloignées. L'exemple des montagnes de San Bernardino autour de Los Angeles (Californie, USA) est le plus connu (Stockwell *et al.* 1997), mais cette situation se retrouve aussi dans le parc du Mercantour au nord de Nice en France (Dalstein *et al.* 2002) ou dans les régions boisées proches d'Athènes en Grèce (Hatzianastassiou *et al.* 2007) ou de Mexico au Mexique (Miller *et al*. 2004).

II.2. Évolution de la concentration en ozone dans la troposphère

Avant l'ère industrielle, la concentration moyenne en ozone dans les couches basses de l'atmosphère se maintenait à un niveau relativement faible, autour de 10 ppb (parties par milliards, en volume) (Guicherit & Roemer 2000). L'intensification des activités industrielles et de transports amorcée au XIX^{ème} siècle s'est accompagnée d'une augmentation massive des émissions anthropiques de NO_x, de COV et autres précurseurs des polluants photochimiques (Marenco *et al.* 1994). La concentration moyenne en ozone dans la troposphère est ainsi passée

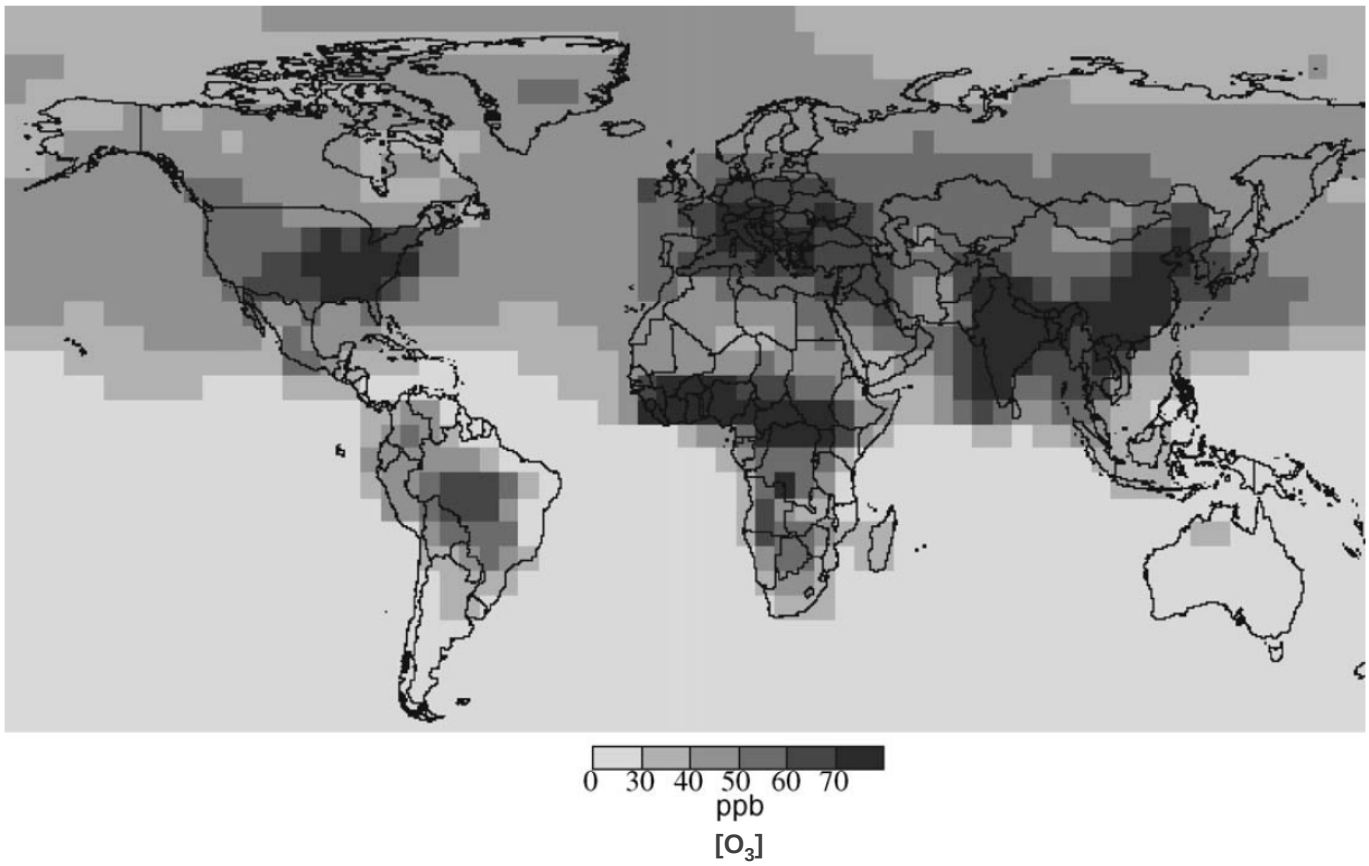


Figure 9 : Projection pour 2030 de la concentration en ozone troposphérique.
Les données ont été générées par le modèle global STOCHEM et correspondent à des moyennes saisonnières maximales.

Source : Collins *et al.* (2000) *Atmospheric Environment*, **34** : 255-267.

de 10 ppb au début du XX^{ème} siècle à une valeur allant de 20 à 45 ppb au tournant du XXI^{ème} siècle (figure 8) (Vingarzan 2004). Les prévisions les plus prudentes situent la concentration moyenne en ozone troposphérique entre 35 et 48 ppb en 2040, et entre 42 et 84 ppb en 2100 (Vingarzan 2004). A cette hausse du niveau de base viennent s'ajouter des épisodes de forte concentration en ozone, parfois supérieure à 100 ppb. Toutefois, la fréquence de ces pics de concentration tend à diminuer, au moins en Europe (de Leeuw 2000). La concentration moyenne en ozone troposphérique est plus importante dans l'hémisphère Nord, urbanisé et industrialisé, que dans l'hémisphère Sud (Oltmans *et al.* 2006). Les modèles globaux de chimie-transport appliqués à l'ozone permettent de simuler l'évolution de sa concentration et de sa distribution dans la troposphère (Collins *et al.* 1997, Wang *et al.* 1998). Le modèle STOCHEM est un modèle 3D de chimie-transport (CTM) de l'ozone troposphérique basé sur le découpage de la surface terrestre en parcelles de 5° de côté (méthode lagra ngienne) (Collins *et al.* 1997). Dans chacune de ces parcelles, la chimie et le transport de l'ozone sont modélisés en prenant en compte un ensemble de données météorologiques (température, pression atmosphérique, humidité relative de l'air, couverture nuageuse, force et direction des vents, précipitations, altitude de la tropopause). Le modèle considère de plus la chimie de l'ozone en intégrant 70 composés et 174 réactions (Fowler *et al.* 1999b). Ce modèle, utilisé pour simuler la distribution globale de l'ozone troposphérique de 1860 à 2100 (Stevenson *et al.* 1998), montre une hausse globale de la concentration moyenne en ozone troposphérique entre 1860 et 1990. Les régions les plus touchées par cette hausse sont l'Europe, le Moyen-Orient et le sud des Etats-Unis. En 2100, si les émissions de précurseurs ne sont pas maîtrisées (scénario *business as usual*), cette tendance va s'accentuer et les régions épargnées par des concentrations en ozone supérieures à 60 ppb se résumeront aux régions polaires et subpolaires, au littoral oriental d'Afrique et d'Amérique du Sud et à l'Océanie (figure 9) (Stevenson *et al.* 1998).

II.3. Conséquences de la pollution à l'ozone pour l'Homme

L'augmentation de la concentration en ozone dans la troposphère est inquiétante à plusieurs égards. En premier lieu, l'ozone troposphérique absorbe le rayonnement solaire infrarouge et se classe au troisième rang des gaz à effet de serre avec une contribution au forçage radiatif correspondant au quart de celle du CO_2 (IPCC 2001). La hausse actuelle de la teneur en ozone troposphérique participe ainsi au renforcement de l'effet de serre et aux changements climatiques qui en découlent. De plus, les propriétés oxydantes de la molécule d'ozone sont responsables de multiples effets néfastes. En tant qu'oxydant puissant, l'ozone peut altérer certains matériaux : plastiques, caoutchouc, peintures, matériaux de construction, etc. (Kucera & Fitz 1995, Lee *et al.* 1996, Massey 1999). Mais l'ozone troposphérique constitue avant tout un polluant dont la toxicité touche le monde vivant en général et l'Homme en

particulier. La participation de l'ozone à la pollution photochimique a été identifiée pour la première fois dans les années 1940 dans le bassin de Los Angeles. La mise en évidence de la présence dans l'air d'un bactéricide connu a très vite suscité des interrogations concernant ses effets sur la santé. Depuis les années 1950 et les premières études faisant état de symptômes associés à une exposition à une concentration élevée en ozone, les effets toxiques du polluant sur la santé ont été largement étudiés.

II.3.1. Altération de la fonction pulmonaire

En tant que polluant gazeux, l'ozone affecte principalement le système respiratoire. Une exposition à une concentration élevée en ozone réduit de manière transitoire la capacité pulmonaire, ce qui se traduit par des signes d'essoufflement et de gêne, voire de douleur, à l'inspiration (McDonnell *et al.* 1999). Cette altération de la fonction pulmonaire est associée à une réduction marquée des paramètres de capacité respiratoire (FEV_1, FVC, TLC et IC) et à une augmentation de la résistance des voies aériennes périphériques (Mudway & Kelly 2000). En outre, une exposition à une dose élevée d'ozone augmente la réactivité des voies aériennes à d'autres polluants (oxydes d'azote ou de soufre) et à divers allergènes (particules, pollens) (Roux *et al.* 2002). Les études portant sur les effets à plus long terme sur la fonction pulmonaire font état d'une réduction, limitée mais irréversible, de la capacité pulmonaire (Mudway & Kelly 2000) et d'un ralentissement du développement des poumons chez l'enfant (Ihorst *et al.* 2004).

II.3.2. Dommages tissulaires et réponse inflammatoire

L'inhalation d'une dose élévée d'ozone provoque de nombreux dommages au niveau de l'épithélium pulmonaire : nécrose des cellules ciliées, déciliation et dégranulation des cellules sécrétrices des voies aériennes supérieures, nécrose de pneumocytes de type I et des cellules ciliées des bronchioles et altération de la perméabilité de l'épithélium pulmonaire (Mudway & Kelly 2000). Une dose élevée d'ozone peut aussi provoquer des réactions inflammatoires au niveau des voies aériennes, caractérisées par une neutrophilie prononcée (Basha *et al.* 1994). L'afflux de neutrophiles vers les poumons peut jouer un rôle bénéfique en favorisant l'élimination des cellules nécrotiques et la régénération de l'épithélium, mais peut aussi amplifier l'inflammation et provoquer des dommages tissulaires. Les effets à long terme d'une exposition chronique à l'ozone incluent la modification de la composition cellulaire de l'épithélium pulmonaire, une perte de sa capacité de diffusion et de l'élasticité pulmonaire due à un dépôt de collagène (Mudway & Kelly 2000).

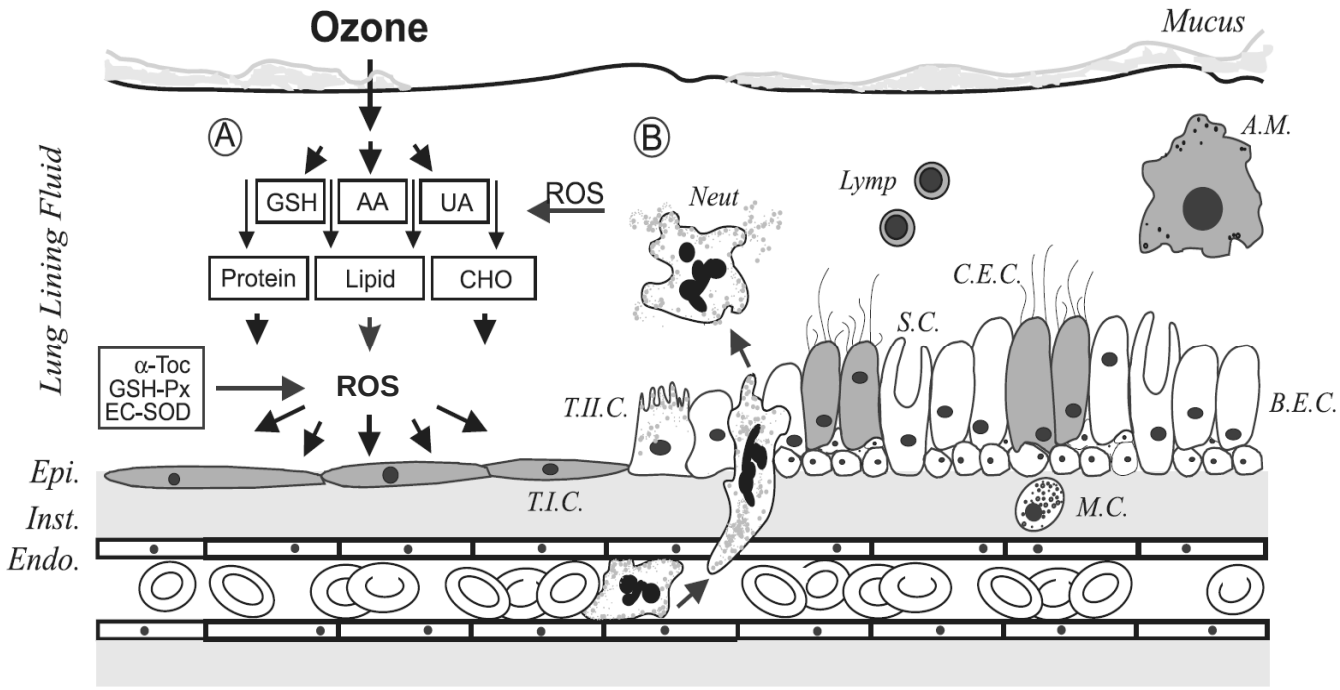


Figure 10 : Mécanismes de la toxicité de l'ozone au niveau du poumon et cibles cellulaires majeures.

A. L'ozone, très réactif mais peu hydrosoluble, se décompose dans le fluide surfactant tapissant les poumons (*lung lining fluid* LLF) au contact de diverses molécules (protéines, lipides et glucides) et des composés antioxydants (AA ascorbate, UA acide urique, GSH glutathion, α-tocophérol). Ces réactions donnent naissance à des espèces oxygénées réactives (ROS) responsables de la propagation du stress oxydant vers l'épithélium pulmonaire. Le système antioxydant limite la formation de ROS grâce à l'activité d'enzymes (GSH-PX glutathion peroxydase, EC-SOD superoxyde dismutase extracellulaire) et la régénération des composés antioxydants. **B.** L'exposition à l'ozone est associée à la migration vers la surface des poumons de neutrophiles (*Neut*) pouvant provoquer un stress oxydant secondaire. Ce stress oxydant cause des dommages sur certains types cellulaires sensibles (*T.I.C.* pneumocytes de type I, *A.M.* macrophages alvéolaires, *C.E.C.* cellules épithéliales ciliées) et induit l'augmentation de la population d'autres types cellulaires (*Lymp* lymphocytes, *M.C*. mastocytes).

Autres abréviations : *Epi.* épithélium, *Inst*. interstitium, *Endo*. endothélium, *T.II.C*. pneumocytes de type II, *B.E.C*. cellule épithéliale bronchique.

Source : Mudway & Kelly (2000) *Molecular Aspect of Medicine*, **21** : 1-48.

II.3.3. Mécanismes de toxicité de l'ozone

Lorsqu'il est inhalé, l'ozone peut pénétrer assez profondément dans les voies aériennes. On estime d'ailleurs que les voies périphériques reçoivent les doses d'ozone les plus élevées et sont les plus sensibles aux dommages associés (Miller *et al.* 1985). Pour autant, la réactivité élévée de l'ozone et sa faible solubilité en milieu aqueux ne lui permettent pas de pénétrer profondément dans les tissus des voies aériennes (Pryor 1992). En fait, l'ozone ne traverse même pas la première barrière rencontrée formée par le fluide tapissant les voies aériennes et s'y décompose entièrement selon un mécanisme dit d'*absorption réactive* (Langford *et al.* 1995). Lorsque la concentration en ozone est faible, la majorité de l'ozone est neutralisée par divers composés antioxydants (ascorbate, acide urique, glutathion, α-tocophérol) présents dans ce fluide (Mudway & Kelly 2000). Lorsque la concentration en ozone est plus élévée, ou que celle en antioxydants est réduite, l'ozone peut réagir avec d'autres molécules telles que des protéines et des lipides (figure 10). La réaction de l'ozone avec ces macromolécules génère des composés toxiques, moins réactifs mais plus stables que l'ozone lui-même et capables de propager son action oxydante vers les cellules épithéliales. Ainsi la toxicité de l'ozone ne résulte pas de son interaction directe avec l'épithélium pulmonaire mais de l'action de produits secondaires issus de sa décomposition dans le fluide tapissant les voies aériennes (Mudway & Kelly 2000). Ces composés, regroupés sous le nom d'espèces oxygénées réactives (ROS), sont responsables de dommages cellulaires et tissulaires directs, mais jouent aussi un rôle dans la transduction du signal de toxicité (Pryor *et al.* 1995).

II.3.4. Épidémiologie

Les maladies respiratoires imposent chaque jour des restrictions d'activité à des millions de personnes. Comme tout facteur altérant la fonction respiratoire, l'ozone est susceptible d'avoir un impact économique et social significatif (Mudway & Kelly 2000). De plus, la toxicité de l'ozone touche fortement les jeunes enfants dont les poumons ne sont pas pleinement développés et les personnes dont la fonction pulmonaire est déjà déficiente (Kinney & Ozkaynak 1991). Les symptômes associés à des maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la bronchite chronique, l'emphysème ou l'insuffisance respiratoire sont exacerbés en cas d'exposition aiguë à l'ozone (Bernstein *et al.* 2004). Par ailleurs, même si l'ozone ne constitue pas à lui seul un facteur de mortalité, l'exposition au polluant peut contribuer à accélérer la mort de personnes déjà malades (COMEAP 1998).

Il est important de noter que le niveau basal actuel de la concentration en ozone dans la troposphère est seulement trois à quatre fois inférieur aux niveaux d'ozone capables d'induire les effets négatifs décrits ici. En comparaison, les concentrations en dioxyde de soufre et d'azote

considérées comme toxiques sont 100 à 1000 fois plus importantes que leurs niveaux de base actuels.

II.3.5. Autres conséquences sur la santé

Si les effets de l'ozone sur la santé humaine se font principalement ressentir au niveau du système respiratoire, d'autres conséquences de sa toxicité ont été plus récemment mises en avant. L'irritation des tissus pulmonaires provoquée par l'ozone peut modifier les propriétés de coagulation du sang (Hermans *et al.* 2005), ce qui peut favoriser l'obstruction de vaisseaux sanguins et du même coup augmenter les risques d'angine de poitrine voire d'infarctus du myocarde (Ruidavets *et al.* 2005). Une exposition aiguë à l'ozone induit de surcroît une vasoconstriction significative des artères brachiales qui constitue un autre facteur de risque d'accident cardiovasculaire (Brook *et al.* 2002). Par ailleurs, certains dérivés de la réaction de l'ozone avec des COV en milieu confiné peuvent aggraver les symptômes d'irritation des yeux (Wolkoff *et al.* 2006). Enfin, l'ozone peut représenter un facteur de stress oxydant pour la peau en affectant l'intégrité structurelle de la couche cornée (Weber *et al.* 2001).

II.3.6. Seuils de risques d'exposition à l'ozone

La présence dans l'air ambiant de teneurs en ozone capables d'induire des dommages physiologiques avérés a entraîné le développement d'un système d'indication des seuils de risques associés au polluant, reposant sur l'établissement de seuils d'alerte en fonction de la concentration ambiante en ozone. En France, le seuil d'information et de recommandation est atteint lorsque la concentration en ozone dans l'air dépasse 180 $\mu g.m^{-3}$ (environ 90 ppb) en moyenne horaire. Les seuils d'alerte sont fixés à 240 $\mu g.m^{-3}$ (≈ 120 ppb) en moyenne horaire durant 3 heures consécutives (niveau 1), à 300 $\mu g.m^{-3}$ (≈ 150 ppb) en moyenne horaire durant 3 heures consécutives (niveau 2) et à 360 $\mu g.m^{-3}$ (≈ 180 ppb) en moyenne horaire (niveau 3). Le niveau d'information et de recommandation correspond à un niveau de concentration en ozone au-delà duquel une exposition de courte durée a des effets limités et transitoires sur la santé des catégories de la population particulièrement sensibles (enfants, personnes âgées, asthmatiques et insuffisants respiratoires chroniques). Il comprend des actions d'information de la population, des recommandations sanitaires aux catégories de la population particulièrement sensibles, ainsi que des recommandations et des mesures visant à réduire certaines des émissions polluantes, telle que la recommandation de limiter la vitesse des véhicules à moteur. Le niveau d'alerte correspond à un niveau de concentration en ozone au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé ou l'environnement. En plus des mesures d'information et de recommandation, ce niveau comprend des mesures de restriction ou de suspension des

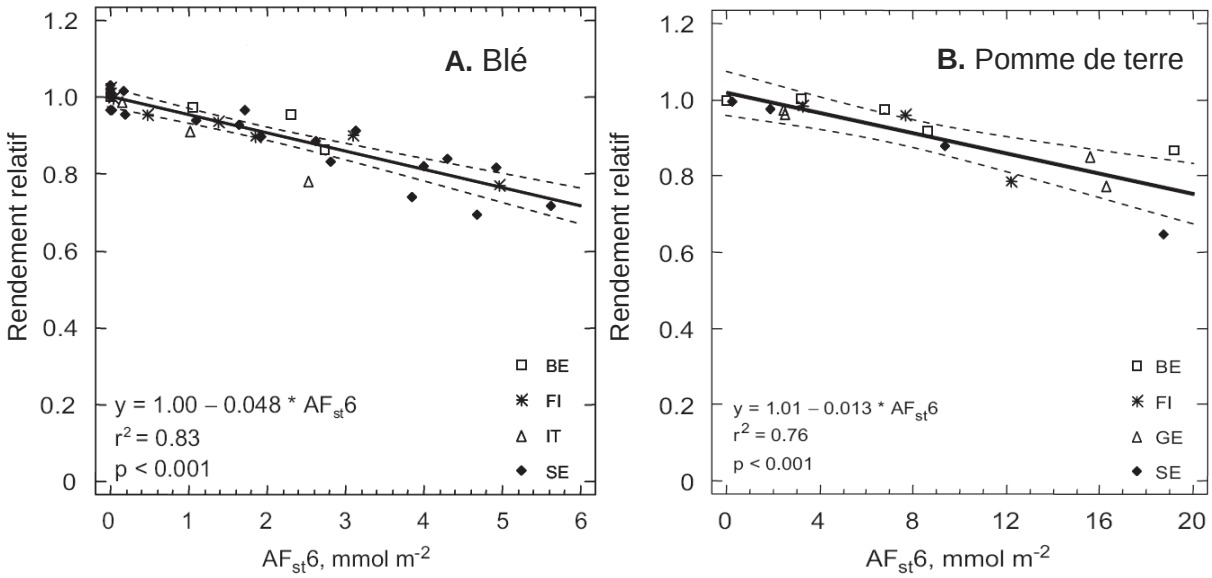


Figure 11 : Relation entre le rendement relatif du blé (**A.**) et de la pomme de terre (**B.**) et la dose cumulée d'ozone décrite par l'indice $AF_{st}6$. La dose cumulée correspond à la somme des valeurs horaires du flux stomatique d'ozone intégrées sur une période de 970°C·jours, déterminé à partir d'un modèle de conductance stomatique et avec un seuil minimal de flux instantané de 6 $nmol.m^{-2}.s^{-1}$. Ces deux relations ont été établies à partir de 13 expériences sur 4 sites européens (BE Belgique, FI Finlande, IT Italie, SE Suède) pour le blé et 8 expériences sur 4 sites (BE Belgique, FI Finlande, GE Allemagne, SE Suède) pour la pomme de terre.

Source : Pleijel *et al*. (2007) *Atmospheric Environment*, **41** (14) : 3022-3040.

activités concourant à la pollution, notamment de la circulation des véhicules. Les trois niveaux d'alertes définis sont associés à l'activation ou au renforcement de certaines mesures selon la gravité de l'épisode de pollution.

III. Impact de l'ozone troposphérique sur la végétation

Dans les années 1940, la mise en évidence de teneurs élevées en ozone dans l'air ambiant de la région de Los Angeles a été suivie des premières observations de dommages visibles sur la végétation. D'abord associés à la pollution photochimique en général (Middleton *et al.* 1950, Haagen-Smit *et al.* 1952), ces symptômes ont par la suite été clairement reliés à la présence d'ozone (Heggestad & Middleton 1959). Depuis ces études originelles, l'impact de l'ozone troposphérique sur les plantes a été amplement documenté et l'ozone est aujourd'hui considéré comme le premier polluant phytotoxique à l'échelle mondiale.

III.1. Impact sur les espèces cultivées

III.1.1. Dommages visibles

L'apparition de symptômes foliaires - tâches chlorotiques et nécrotiques, rougissement - est la conséquence la plus visible de la pollution due à l'ozone troposphérique sur la végétation. Ce type de dommages, associé à des épisodes de fortes concentrations en ozone, entraîne des pertes économiques immédiates pour les espèces horticoles dont l'apparence revêt une importance particulière. De tels symptômes sont régulièrement observés en Amérique du Nord et en Europe, notamment au niveau des cultures irriguées des régions méditerranéennes, mais sont aussi signalés au Mexique, en Egypte, en Inde ou à Taiwan (Ashmore 2005).

III.1.2. Croissance et rendement

En plus et souvent indépendamment de ces symptômes aigus, l'exposition chronique au polluant est responsable de pertes significatives de croissance et de rendement pour de nombreuses espèces de première importance agronomique. En Europe, l'exposition à l'ozone pendant une saison de croissance peut réduire de 25 % le rendement du blé et de la pomme de terre (figure 11) (Pleijel *et al.* 2007). Les résultats d'une étude menée aux USA dans les années 1980 dans le cadre du NCLAN (*National Crop Loss Assessment Network*) montrent qu'une concentration moyenne en ozone supérieure à 50 ppb sur une saison de végétation peut réduire

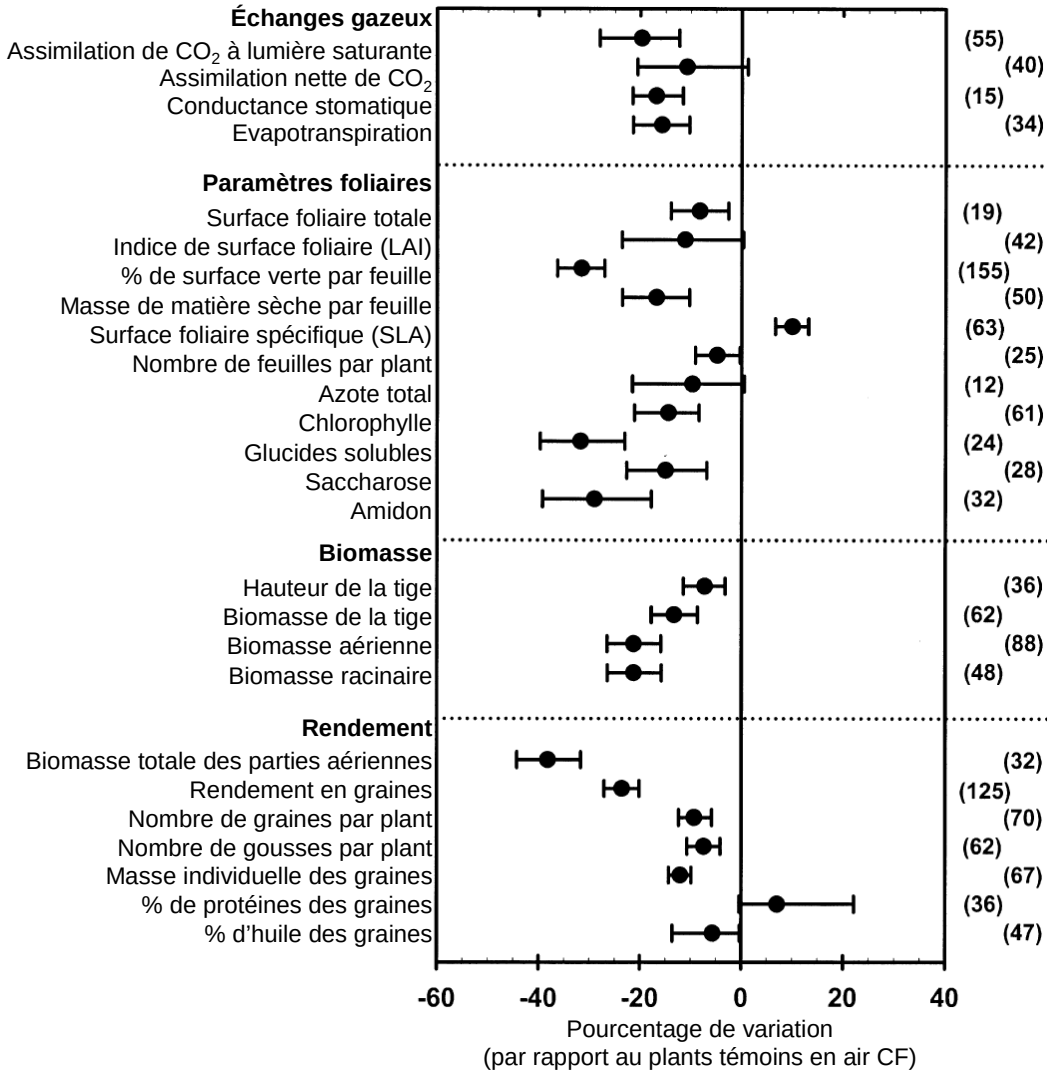


Figure 12 : Effets d'une concentration élevée en ozone ([O_3] > 30 ppb) sur le soja : méta-analyse de 53 études publiées. La réponse des paramètres est déterminée à partir du rapport moyen entre les valeurs mesurées pour les plants traités par rapport à celles mesurées pour les plants en atmosphère filtrée. Chaque point correspond au pourcentage de variation dans les plants traités par rapport aux plants en atmosphère filtrée avec l'intervalle de confiance à 95% correspondant. La réponse à l'ozone est considérée comme significative si l'intervalle de confiance ne couvre pas l'axe des ordonnées. Le nombre de valeurs indépendantes pour chaque paramètre est indiqué entre parenthèses.

Source : Morgan *et al*. (2004) *Plant, Cell and Environment*, **26** : 1317-1328.

le rendement annuel du soja de 10 % et celui du cotonnier de 12 % (Heagle 1989). Une méta-analyse de l'impact de l'ozone sur le soja portant sur 53 publications a mis en évidence une réduction de 20 % du rendement du soja en réponse à une exposition chronique, combinée à la diminution d'un grand nombre de paramètres de croissance et physiologiques (figure 12) (Morgan *et al.* 2003). Des pertes de rendement dues à l'ozone ont été rapportées pour le blé, le riz et le soja au Pakistan, pour la tomate en Inde, pour le haricot au Mexique et pour le radis et le navet en Egypte (Ashmore 2005). Le rendement du maïs et des monocotylédones semble en général moins affecté par le polluant (Felzer *et al.* 2007).

III.1.3. Photosynthèse

L'effet négatif de l'ozone sur la croissance résulte principalement d'une limitation de la fixation du CO_2 atmosphérique (Fuhrer 2003) due à une réduction de l'activité et de la quantité de la rubisco (Lehnherr *et al.* 1987, Enyedi *et al.* 1992) à laquelle s'ajoutent une dégradation prononcée de la chlorophylle et une sénescence accélérée (Ojenperä *et al.* 1998). Pour un certain nombre d'espèces cultivées (blé, haricot, tomate, navet, potiron, fétuque) une réduction marquée de la capacité de transport d'électrons photosynthétiques a été démontrée en réponse à l'ozone (Fiscus *et al.* 2005). Chez le maïs, des concentrations réalistes en ozone se sont révélées capables de réduire à la fois la fixation du CO_2 et la photochimie (Leitao *et al.* 2007). Pour cette espèce en C4, l'ozone affecte négativement l'activité des deux enzymes responsables de l'assimilation du CO_2, la rubisco et la PEPc. Chez les C3, ces deux enzymes montrent une réponse opposée à l'ozone, l'inhibition de la rubisco étant coordonnée à une stimulatin de la PEPc (pois Leitao *et al. sous presse*, pin d'alep Fontaine *et al.* 1999).

Les résultats concernant les conséquences d'une exposition à l'ozone sur les stomates demeurent assez contradictoires. Il est généralement admis que la réduction de la conductance stomatique en réponse au polluant serait un effet secondaire de l'atteinte de la photosynthèse plutôt qu'une de ses causes, l'augmentation de la concentration interne en CO_2 initiant la fermeture partielle des stomates (Fiscus *et al.* 1997). Pour autant, l'ozone pourrait avoir un effet direct sur les cellules de garde via la formation de peroxyde d'hydrogène et son action sur les canaux calciques membranaires (Fiscus *et al.* 2005).

III.1.4. Allocation des photosynthétats

La restriction de la capacité photosynthétique dans les feuilles *sources* réduit la quantité de glucides disponibles pour l'export vers les organes *puits* telles que les racines, les organes de reproduction et les méristèmes végétatifs (Fuhrer & Booker 2003). La diminution de l'allocation aux organes *puits* peut ainsi entraîner un déficit de croissance des parties racinaires par rapport

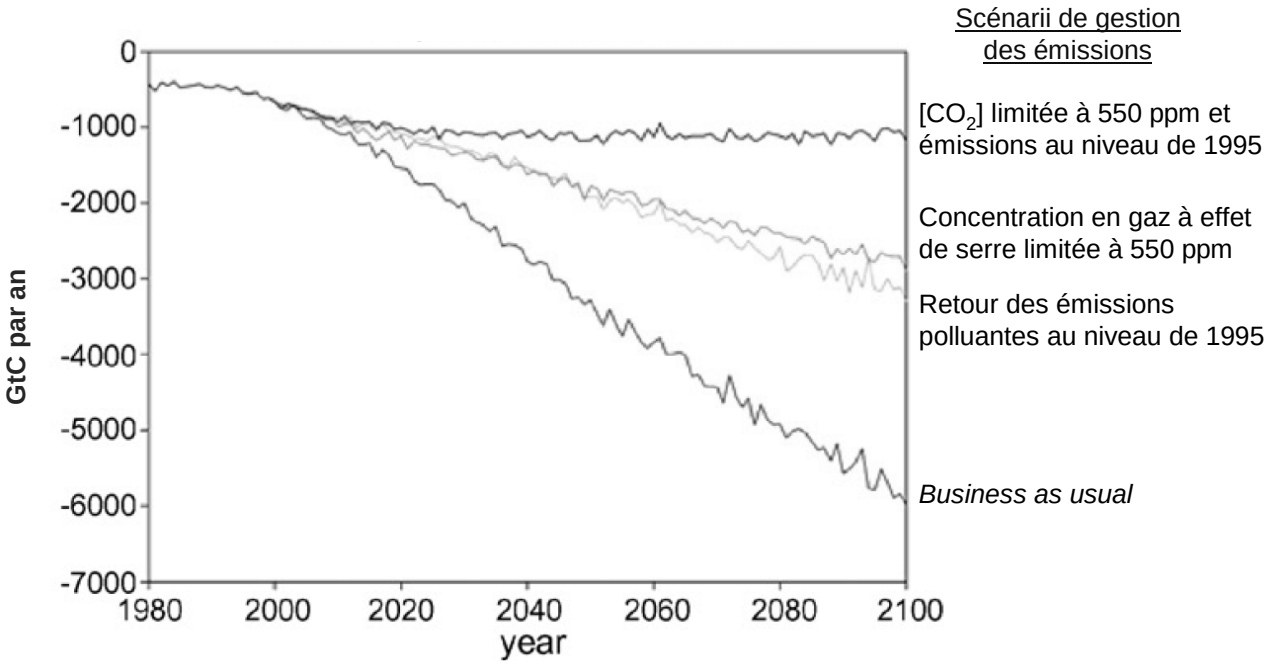


Figure 13 : Pertes de rendement des récoltes due à l'ozone (en gigatonnes de carbone par an) selon quatre scénarii de gestion future des émissions.

Source : Felzer et al. (2007) *C. R. Geoscience*, **339** (11-12) : 784-798.

aux parties aériennes (Grantz *et al.* 2006) et une réduction du rendement des récoltes *via* une restriction de l'allocation aux graines et aux fruits (Black *et al.* 2000). Un effet négatif direct sur la capacité d'allocation des organes *sources* a été montré chez le cotonnier et pourrait contribuer de façon importante à la réduction de croissance globale due à l'ozone (Grantz 2003). Cette inhibition de la fonction de *charge du phloème* pourrait mettre en jeu des dommages oxydatifs sur les transporteurs membranaires impliqués (Grantz & Farrar 1999).

III.1.5. Reproduction

Les processus liés à la reproduction peuvent être touchés par l'exposition à l'ozone. Divers effets ont été rapportés pour les plantes cultivées : inhibition de la germination du pollen et de la croissance du tube pollinique, déclenchement retardé de la floraison, modification des caractéristiques florales, réduction du nombre de fleurs produites, perte de rendement en fruits et en graines, réduction du taux de germination des graines et de la vigueur des pousses (Black *et al.* 2000). Ces effets ont été observés pour des plantes dont les organes végétatifs et reproducteurs étaient exposés à l'ozone simultanément et peuvent donc provenir indifféremment de dommages directs au niveau des organes reproducteurs ou résulter des dommages aux organes végétatifs, *via* la réduction de la photosynthèse et de l'export d'assimilats. Des expériences d'exposition directe des organes reproducteurs ont toutefois montré que l'ozone pouvait altérer le développement floral, réduire le nombre de graines, modifier leur qualité et la vigueur de pousses (Black *et al.* 2000).

III.1.6. Autres aspects agronomiques

L'exposition à l'ozone a en outre des conséquences sur la qualité de divers produits agricoles : augmentation de la concentration en azote dans le grain de blé, altération de la qualité des fibres de coton, du tubercule de pomme de terre et de la pastèque ou diminution de la teneur en huile, en protéines et en glucides dans les graines de colza (Black *et al.* 2000). L'ozone est aussi susceptible de modifier l'impact d'autres facteurs de réduction de croissance, maladies, prédation et compétition avec des espèces adventices (Fuhrer 2003). La hausse des teneurs en glucides dans les feuilles de plants de blé traités à l'ozone paraît ainsi favoriser la prédation par les insectes. Des effets directs sur les espèces prédatrices ont aussi été constatés : augmentation de l'oviposition sur le tabac, accroissement du taux de survie et de croissance de certaines larves. La sensibilité des plantes aux maladies est modifiée par l'ozone de façon variable. On a ainsi observé une accentuation des symptômes foliaires associés à diverses maladies chez le blé, mais une résistance accrue chez l'orge, la fétuque et colza. La sensibilité du blé au mildiou semble réduite lors d'une exposition à l'ozone mais la fréquence

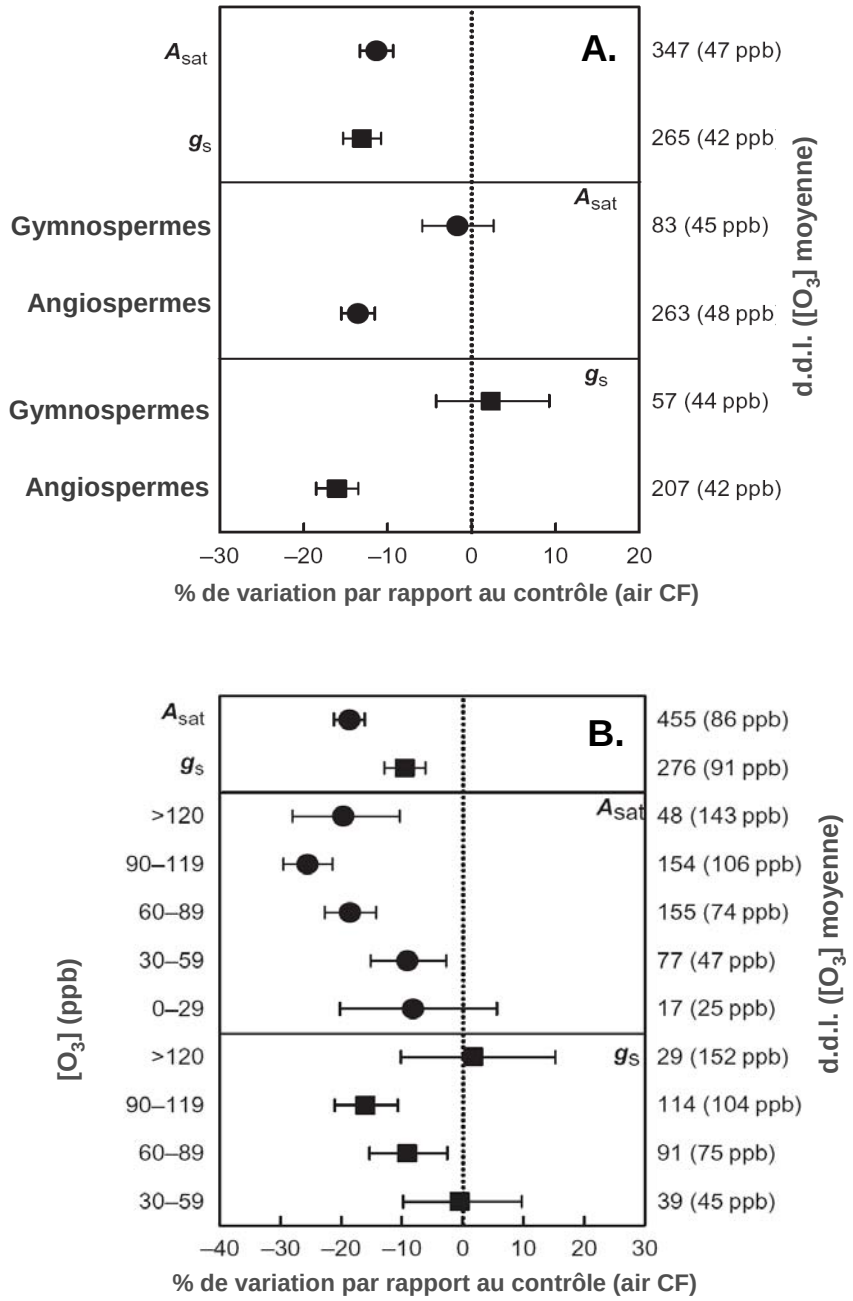


Figure 14 : Effets de concentrations ambiantes (**A.**) et élevées (**B.**) en ozone sur l'assimilation de CO_2 à intensité lumineuse saturante (A_{sat}) et la conductance stomatique (g_s) des arbres : méta-analyse de 61 (A_{sat}) et 55 (g_s) études publiées. La réponse de ces deux paramètres est déterminée à partir du rapport moyen entre les valeurs mesurées pour les plants traités par rapport à celles mesurées pour les plants en atmosphère filtrée. Chaque point correspond au pourcentage de variation dans les plants traités par rapport aux plants en atmosphère filtrée avec l'intervalle de confiance à 95% correspondant. La réponse à l'ozone est considérée comme significative si l'intervalle de confiance ne couvre pas l'axe des ordonnées. Le degré de liberté (d.d.l.) pour chaque valeur est indiqué à droite et la concentration moyenne en ozone associée est notée entre parenthèses.

Source : Wittig *et al*. (2007) *Plant, Cell and Environment*, **30** (9) : 1150-1162.

d'infection par des pathogènes facultatifs est accrue. Enfin, l'ozone est susceptible de modifier les relations entre espèces cultivées et adventices en compétition pour les mêmes ressources (Fuhrer 2003) ainsi que les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Fuhrer & Booker 2003). Ces deux aspects restent toutefois assez méconnus, tout comme les conséquences de l'augmentation de la concentration en ozone sur la qualité du fourrage. L'impact du polluant sur le métabolisme des herbacées pérennes de prairie et de pâturage provoque des modifications de la composition chimique des feuilles ainsi qu'une sénescence précoce, ce qui entraîne une altération de la digestibilité des parties aériennes par les ruminants (Ashmore 2005).

III.1.7. Impact sur les agroécosystèmes

A l'échelle mondiale et selon la gestion future des émissions de gaz à effet de serre et de polluants, la hausse de la concentration en ozone dans la troposphère prévue pour 2100 pourrait réduire le rendement global des récoltes de 16 % selon le scénario le plus optimiste, et de 64 % selon les prédictions les plus pessimistes (figure 13) (Reilly *et al.* 2007). D'un point de vue économique, les coûts engendrés par les pertes de production agricole dues à l'ozone atteignent à l'heure actuelle de 2 à 4 milliards de dollars aux Etats-Unis et 4 milliards d'Euros en Europe (Ashmore 2005). La surface agricole exposée à des concentrations en ozone susceptibles de réduire de 10% leur rendement pourrait passer de 9-35 % en 1985 à 30-75 % en 2020 (Chameides *et al.* 1994), et cette augmentation pourrait concerner en grande partie l'Asie (Wang & Mauzerall 2004).

III.2. Impact sur les arbres forestiers

III.2.1. Symptômes visibles et croissance

Les programmes de surveillance mis en place en Amérique du Nord et en Europe ont démontré que les symptômes visibles observés en réponse à l'ozone étaient répandus au sein de la végétation naturelle, et en particulier chez les espèces forestières sensibles (Ashmore 2005). De tels symptômes ont ainsi été décrits dans les régions montagneuses boisées autour de Mexico, où on observe une situation et des teneurs en ozone comparables à celles des montagnes de San Bernardino proches de Los Angeles (Miller *et al.* 1994). Mise à part quelques espèces (tulipier, pin loblolly et pin blanc) pour lesquelles une corrélation entre symptômes foliaires et réduction de croissance a été mise en évidence, une exposition chronique à l'ozone peut toucher la physiologie de nombreuses espèces d'arbres sans apparition de dommages visibles (Felzer *et al.* 2007). La plupart des effets physiologiques de l'ozone sur les plantes

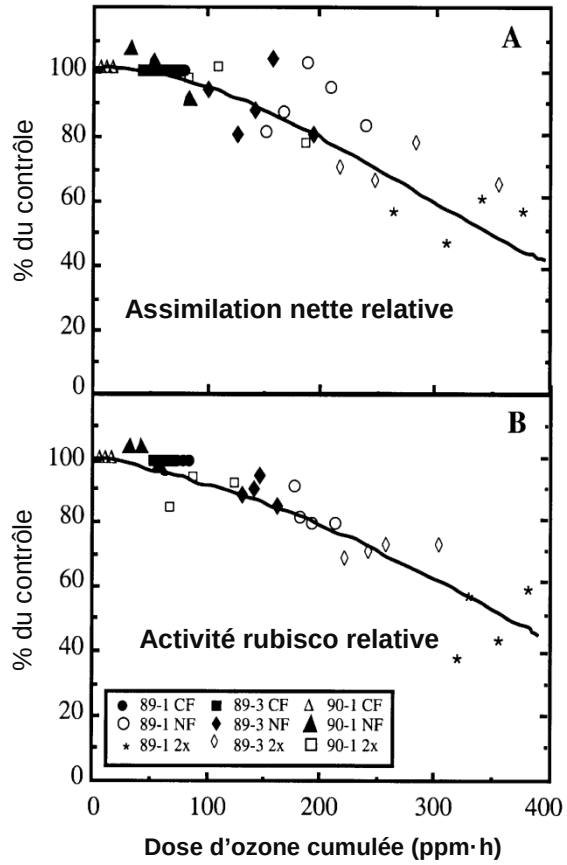


Figure 15 : Réponse de l'assimilation nette de CO_2 et de l'activité rubisco à une exposition à l'ozone chez le pin loblolly. Les valeurs relatives correspondent aux valeurs mesurées pour les arbres exposés à une concentration ambiante ou enrichie deux fois en ozone par rapport aux valeurs mesurées pour les arbres en atmosphère filtrée. Les mesures ont été réalisées lors du premier (89-1) et du troisième (89-3) *flushes* de croissance en 1989, et lors du premier *flush* en 1990 (90-1).

Source : Dizengremel *et al*. (1994) *Journal of Plant Physiology*, **26** : 1317-1328.

cultivées peut s'appliquer aux arbres, qui apparaissent toutefois moins sensibles. En comparant 20 études en chambres à ciel ouvert (*open top chambers*, OTC) portant sur une gamme étendue de plantes, Reich (1987) a évalué la réduction de croissance causée par une dose cumulée d'ozone de 20 ppm·h sur une saison de végétation à 7 % pour les conifères, 36 % pour les arbres caducifoliés et 73 % pour les espèces cultivées, avec une diminution moins prononcée de l'assimilation nette de CO_2 de 3 % pour les conifères, 13 % pour les arbres caducifoliés et 30 % pour les espèces cultivées. La différence de sensibilité à l'ozone entre conifères, feuillus et espèces cultivées est généralement attribuée aux variations de conductance stomatique. Le flux d'ozone entrant dans les tissus foliaires étant corrélé à la conductance stomatique, les espèces cultivées herbacées, qui présentent la conductance la plus élévée, seraient les plus sensibles au polluant et les conifères, dont la conductance stomatique est plus faible, les plus résistants, avec les arbres caducifoliés en situation intermédiaire.

III.2.2. Photosynthèse

Saxe (2002), dans une étude comparable portant sur 39 espèces d'arbres, a déterminé une réduction significative de la photosynthèse de 35 % pour les arbres caducifoliés et de 21 % pour les conifères exposés à une dose cumulée moyenne de 7,8 ppm·h. Ces valeurs sont associées à une diminution non significative de la conductance stomatique de 21 % pour les feuillus et de 16 % pour les conifères. Plus récemment, une étude fondée sur une méta-analyse statistique de plusieurs centaines de résultats publiés sur les arbres indique une réduction de 11 % de l'assimilation nette de CO_2 à lumière saturante (A_{sat}) et de 13 % de la conductance stomatique (g_s) pour une exposition chronique à une concentration moyenne en ozone de 47 et 42 ppb respectivement (figure 14) (Wittig *et al.* 2007). Chez les angiospermes, l'ozone réduit A_{sat} et g_s de 14 % et 16 % respectivement alors que les gymnospermes n'affichent pas de réponse significative. Il est important de noter que ces valeurs ont été calculées pour des arbres soumis à des concentrations *ambiantes* en ozone par rapport à des arbres placés en atmosphère filtrée par charbon actif (*charcoal-filtered*, CF). Lorsque les arbres en atmosphère filtrée sont comparés aux arbres exposés à des teneurs élevées en ozone (85 et 91 ppb), la photosynthèse est plus fortement affectée (-19 %) alors que la conductance stomatique montre une diminution équivalente (-10 %). De plus, gymnospermes et angiospermes sont touchés de la même manière. Les résultats de cette étude indiquent que (i) la concentration actuelle en ozone dans la troposphère est susceptible de réduire de façon *significative* la photosynthèse des arbres gymnospermes des forêts tempérées et boréales, largement majoritaires dans cette étude, et que (ii) ces effets négatifs pourraient empirer et toucher les conifères si la teneur en ozone troposphérique continuait à augmenter (Wittig *et al.* 2007). Ces conclusions sont d'autant plus significatives que les écosystèmes forestiers tempérés et boréaux représentent environ 17 % de

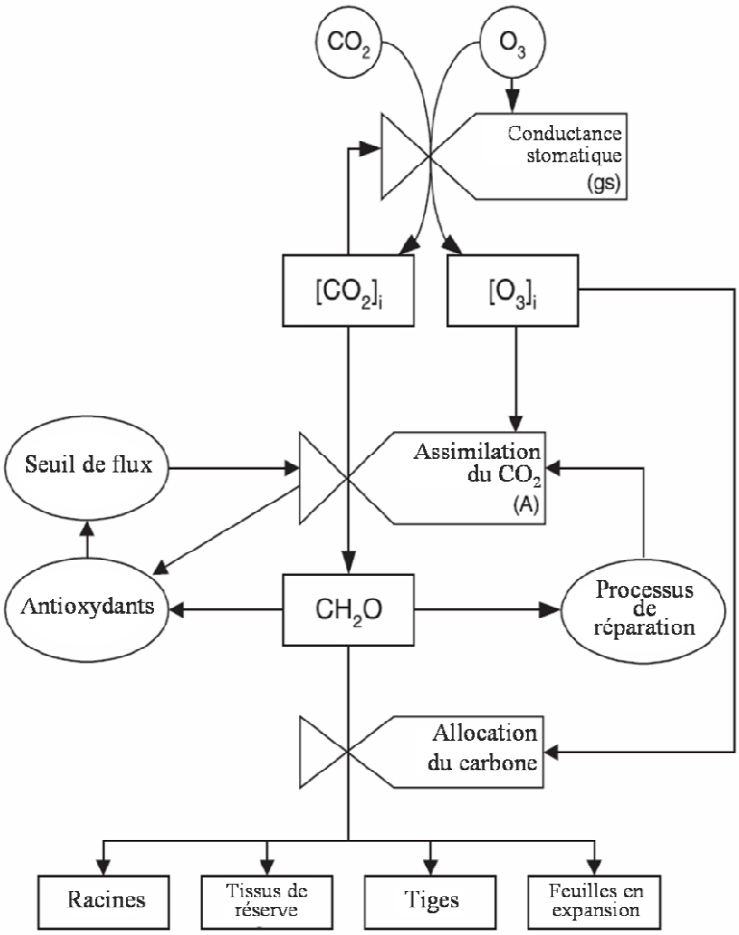


Figure 16 : Modèle conceptuel de l'interaction du CO_2 et de l'ozone sur l'assimilation de CO_2 et l'allocation des photosynthétats (CH_2O) en relation avec les processus de détoxication et de réparation.

Source : Fuhrer & Booker (2003) *Environment International*, **29** : 141-154.

la productivité primaire nette (NPP) et 29 % de la capacité de séquestration de CO_2 des écosystèmes terrestres (Grace 2004).

La baisse de la conductance stomatique ne peut pas expliquer en totalité la réduction de l'assimilation nette de CO_2 due à l'ozone (Wittig *et al.* 2007). Mesurée la plupart du temps après l'atteinte de la photosynthèse, la fermeture stomatique en serait plutôt un effet secondaire, lié au maintien du C_i (Noormets *et al.* 2001). La restriction de la capacité photosynthétique résulte d'effets combinés sur les processus anaboliques (cycle de Calvin) et photochimiques (pigments, photosystèmes) (Saxe 2002). La rubisco apparaît particulièrement sensible à l'ozone (Pell *et al.* 1994b). Sur une saison de croissance entière, Dizengremel *et al*. (1994) ont montré chez le pin loblolly une réduction parallèle de la photosynthèse et de l'activité rubisco (figure 15). Chez le pin d'alep, une diminution de la quantité de protéines de la grande sous-unité de la rubisco et de la rubisco activase est corrélée à la baisse de l'activité rubisco (Pelloux *et al.* 2001). L'effet d'une exposition chronique à l'ozone sur la rubisco a aussi été rapporté chez les angiospermes : peuplier (Pell *et al.* 1992), érable à sucre (Gaucher *et al.* 2003), hêtre (Lutz *et al.* 2000) et bouleau (Matyssek *et al.* 1991). A la réduction de la fixation du CO_2 par la rubisco s'ajoutent des perturbations des processus photochimiques : diminution des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) et déstabilisation de l'antenne collectrice du PSII (Saxe 2002). On estime toutefois que les processus de fixation du CO_2 - cycle de Calvin en général, et rubisco en particulier - sont plus sensibles à l'ozone que ceux associés à la photochimie (Saxe 2002).

III.2.3. Sénescence foliaire accélérée

La sénescence foliaire accélérée en réponse à une exposition chronique à l'ozone est un symptôme commun à un grand nombre de plantes (Pell *et al.* 1997). Un tel phénomène a été observé chez diverses espèces d'arbres : hêtre (Nunn *et al.* 2005), bouleau (Pääkkönen *et al.* 1997), peuplier (*P. nigra,* Bortier *et al.* 2000b; *P. maximowiczii,* Brendley & Pell 1998; *P. tremula* Matyssek *et al.* 1993), chêne vert, olivier et caroubier (Ribas *et al.* 2005). Certains effets physiologiques de l'ozone, en particulier la dégradation de la chlorophylle et de la rubisco, sont semblables aux évènements associés à la sénescence foliaire naturelle (Keech *et al.* 2007), mais les mécanismes en jeu restent incertains. La dégradation de la chlorophylle et de la rubisco pourrait être une conséquence directe de l'exposition à l'ozone et initier la sénescence foliaire, ou résulter du déclenchement de la sénescence foliaire par l'ozone par d'autres voies (Pell *et al.* 1994a). Dans certains cas, la sénescence précoce peut être compensée par une production accrue de nouvelles feuilles (Woodbury *et al.* 1994), mais la mise en place d'un tel mécanisme compensatoire se ferait au détriment de l'export de photosynthétats vers les racines (Ashmore 2005).

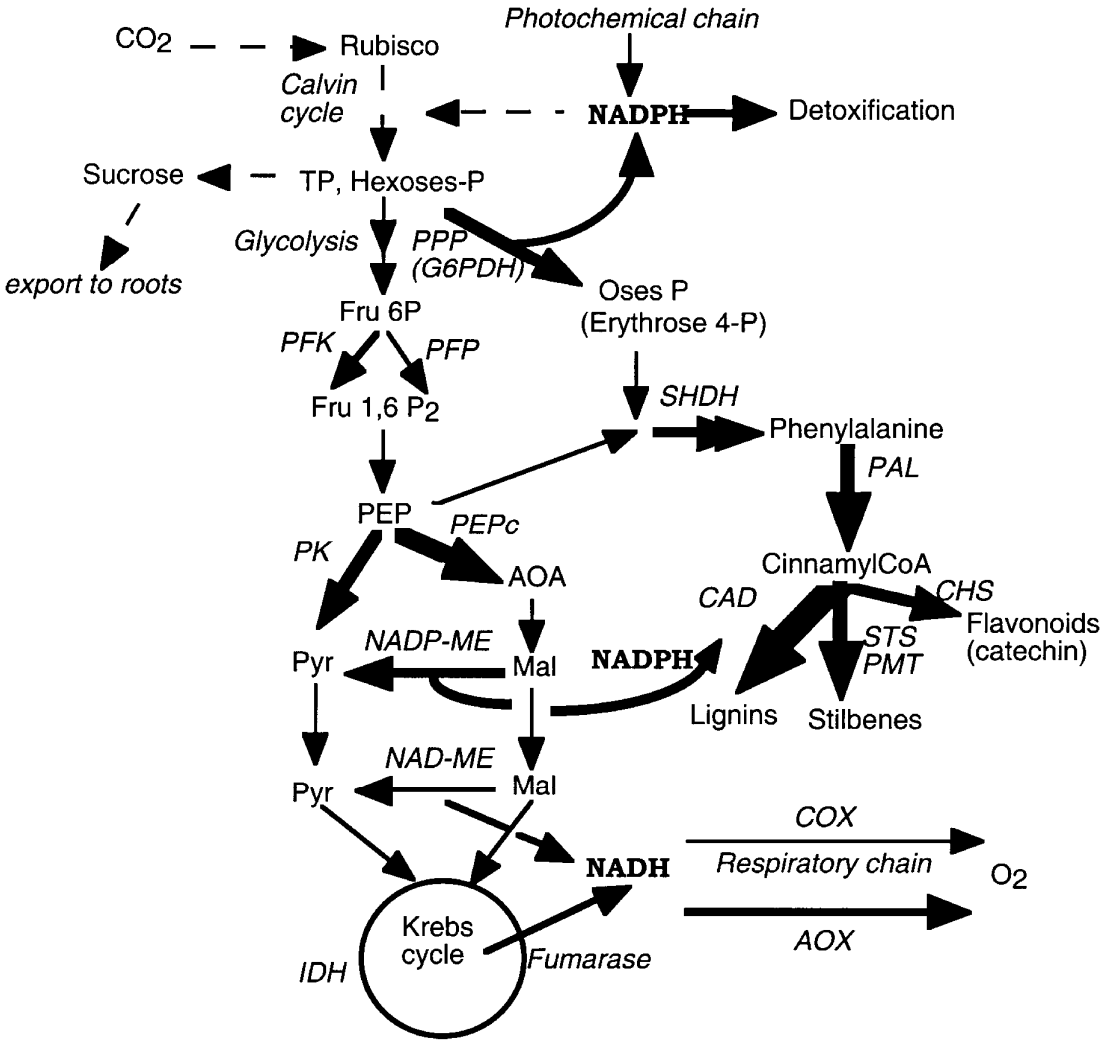


Figure 17 : Effets de l'ozone sur les voies métaboliques et les enzymes associées au métabolisme carboné des arbres. Les flèches en pointillés indiquent une inhibition, les flèches pleines une stimulation, d'autant plus forte que le trait est épais.

Abréviations : AOX, alternative oxydase; CAD, cinnamyl alcool déshydrogénase; CHS, chalcone synthase; COX, cytochrome oxydase; G6PDH, glucose 6-phosphate déshydrogénase; IDH, isocitrate déshydrogénase; ME, enzyme malique (à NAD et NADP); PAL, phénylalanine ammonia lyase; PEPc, phosphoenolpyruvate carboxylase; PFK, Phosphofructokinase; PFP, Pyrophosphate fructose 6-phosphate phosphotransférase; PK, pyruvate kinase; PPP, voie des pentoses phosphate; PMT, pinosylvine méthyl transférase; SHDH, shikimate déshydrogénase; STS, stilbène synthase.

Source : Dizengremel (2001) *Plant Physiology and Biochemistry*, **39** : 729-742.

III.2.4. Allocation de carbone aux racines

La réduction de l'allocation de carbone aux parties racinaires est une réponse effective et générale, bien que variable, des plantes à l'ozone (Grantz *et al.* 2006). Concernant les arbres, une augmentation de la teneur en glucides dans les feuilles, indicatrice d'une possible diminution de l'export de carbone vers les organes *puits*, a été mise en évidence pour des plants juvéniles de bouleau (Oksanen & Rousi 2001) et de peuplier (Landolt *et al.* 1994) exposés au polluant. Une réduction de la croissance racinaire a été de surcroît mesurée pour des pins ponderosa adultes de la région de Los Angeles, exposés en milieu naturel à de fortes concentrations en ozone (Grulke *et al.* 1998). Plus récemment, une étude méta-analytique réalisée par Grantz *et al*. (2006) indique une réduction moyenne de 24 % du coefficient allométrique de répartition de la biomasse entre parties racinaires et aériennes pour huit espèces d'arbres forestiers. Selon un modèle de croissance du tremble, l'ozone pourrait aussi réduire la croissance racinaire en provoquant la sénescence accélérée des feuilles basses de la canopée, principales sources de photosynthétats pour les racines (Martin *et al.* 2001).

III.2.5. Reproduction

Contrairement aux espèces cultivées, peu de données sont disponibles quant aux effets du polluant sur la reproduction des arbres. On peut cependant penser que l'ozone, en altérant la photosynthèse et la capacité d'export des assimilats, est susceptible d'entraîner pour les arbres également une restriction de l'allocation d'assimilats vers les organes reproducteurs (Saxe 2002). L'inhibition par l'ozone du taux de germination du pollen et de la croissance du tube pollinique observée chez six arbres fruitiers (Hormaza *et al.* 1996) confirme cette présomption.

III.2.6. Respiration mitochondriale

La stimulation de la respiration mitochondriale et des processus cataboliques constitue un autre effet important de l'ozone sur la physiologie de l'arbre (figure 17). Une augmentation de la respiration mitochondriale foliaire en réponse à une exposition chronique a notamment été mesurée chez le peuplier, le bouleau, l'épicéa, le pin sylvestre (Dizengremel 2001) et l'érable à sucre (Tjoelker *et al.* 1995). Cette augmentation du dégagement de CO_2 lié aux dégradations oxydatives mitochondriales est accompagnée par la stimulation de l'activité d'enzymes associées aux processus cataboliques, glycolyse, voie des pentoses phosphate et cycle de Krebs (Dizengremel 2001). Parmi ces enzymes, la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc) se montre particulièrement sensible à une exposition à l'ozone puisque son activité est stimulée deux à cinq fois selon les espèces (Dizengremel 2001). Chez les plantes en C3, l'activité catalytique de la

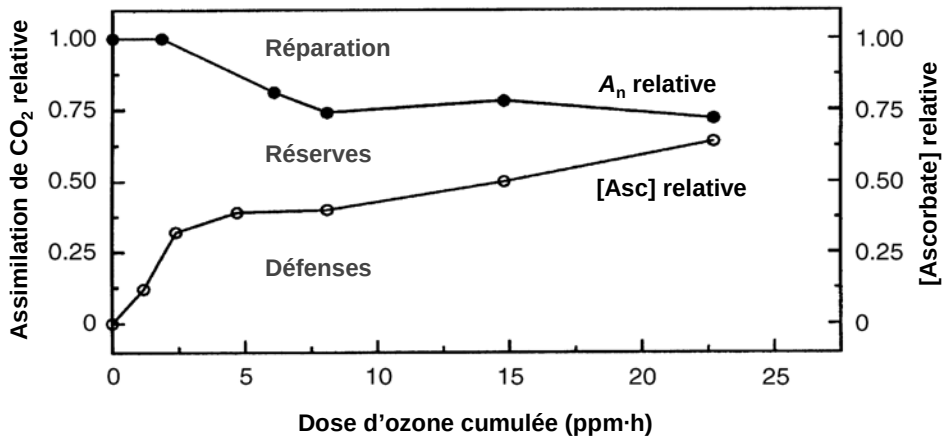


Figure 18 : Réponse de l'assimilation nette de CO_2 et de la concentration totale en ascorbate à une exposition à l'ozone chez l'épicéa. En considérant que la photosynthèse rend compte du gain de carbone et la concentration en ascorbate des coûts métaboliques associés à la détoxication, les proportions relatives du carbone assimilé engagé dans les processus de détoxication, de réparation et de mise en réserve peuvent être estimées.

Source : Wieser & Matyssek (2007) *New Phytologist*, **174** : 7-9.

PEPc contribue à la voie anaplérotique d'approvisionnement du cycle de Krebs en squelettes carbonés lorsque la demande associée à la synthèse d'acides aminés est forte (Chollet *et al.* 1996). Lors d'une exposition à l'ozone, la stimulation de la PEPc pourrait permettre de maintenir l'alimentation du cycle de Krebs malgré la baisse de la photosynthèse (Tietz & Wild 1991). Plus généralement, l'activation du catabolisme en réponse à l'ozone témoigne d'une demande accrue en énergie et en pouvoir réducteur pour le métabolisme secondaire et les processus de détoxication et de réparation (Pell *et al.* 1997, Saxe 2002).

III.2.7. Métabolisme secondaire et système antioxydant

Une accumulation de composés dits de stress, issus du métabolisme secondaire, est observée dans les feuilles de diverses espèces d'arbres en réponse à l'ozone (Langebartels *et al.* 1997). La nature de ces métabolites est variable : flavonoïdes (anthocyanes, catéchine), phytoalexines (stillbènes), polyphénols pariétaux (lignines), polyamines (putrescine). Tous présentent, à un degré variable, un rôle potentiel de protection. Sous ozone, l'accumulation de ces composés est accompagnée de la stimulation de l'activité de plusieurs enzymes clés de la voie de biosynthèse des polyphénols : phénylalanine amino-lyase (PAL), shikimate déshydrogénase (SHDH), stillbène synthétase (STS), pinosylvine méthyl-transférase (PMT), et chalcone synthétase (CHS) (Dizengremel 2001). L'exposition à l'ozone mobilise en outre les processus de détoxication et de réparation (Kangasjärvi *et al.* 1994), ce qui entraîne des coûts métaboliques supplémentaires pour la synthèse des composés antioxydants (ascorbate, glutathion, α-tocophérol) et le fonctionnement des enzymes associées (superoxyde dismutase, catalase, ascorbate peroxydase, glutathion-S-transférase) (Pell *et al.* 1997, Tausz *et al.* 2007). L'activation du métabolisme secondaire et du système antioxydant impose des coûts métaboliques importants alors même que l'apport de carbone et d'énergie via la photosynthèse est réduit, ce qui déséquilibre davantage le budget métabolique de l'arbre (Wieser & Matyssek 2007). Même si la mobilisation des réserves carbonées permet un ajustement limité, une exposition prolongée à l'ozone compromet la capacité d'accumulation de biomasse et de mise en réserve de l'arbre (figure 18).

III.2.8. Impact sur les écosystèmes forestiers

La majorité des dommages physiologiques présentés ici peut être provoquée par une exposition à des concentrations régulièrement atteintes dans la nature et les effets négatifs de l'ozone sur la physiologie et la croissance de l'arbre sont susceptibles de se répercuter à l'échelle de l'écosystème. L'utilisation de modèles globaux permet de simuler l'exposition de la végétation à l'échelle terrestre (Fowler *et al.* 1999a). Le modèle STOCHEM de chimie-transport

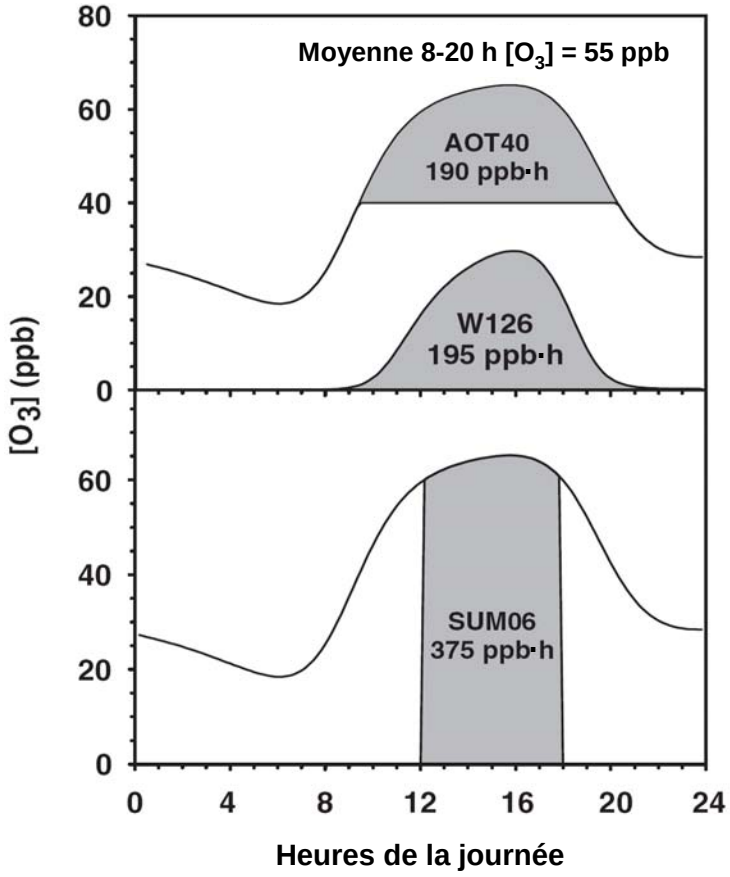


Figure 19 : Indices d'exposition à l'ozone dérivés de la concentration ambiante.

AOT40 = $\Sigma([O_3] - 40)$ pour $[O_3] > 40$ ppb

W126 = $\Sigma([O_3].W)$ avec $W = 1/(1 + 4403(\exp^{-0,126[O_3]})$

SUM06 = $\Sigma[O_3]$ pour $[O_3] > 60$ ppb

La valeur déterminée par chaque méthode à partir d'un même relevé de concentration en ozone est exprimée en ppb·h.

Source : Fiscus *et al*. (2005) *Plant, Cell and Environment*, **28** : 997-1011.

de l'ozone troposphérique (Collins *et al.* 1997) a été utilisé pour simuler la distribution globale de l'ozone troposphérique de 1860 à 2100 (Fowler *et al.* 1999b). En superposant les cartes obtenues à celles des couverts forestiers, il est possible d'estimer la surface de forêt potentiellement exposée à une concentration critique en ozone fixée à 60 ppb (Fowler *et al.* 1999a), concentration effectivement capable d'induire des effets physiologiques significatifs sur les arbres forestiers (Wittig *et al.* 2007). Les résultats obtenus indiquent que la surface de forêt exposée à des épisodes où la concentration en ozone dépasse 60 ppb passe de 0 en 1860 à 2 millions de km² en 1950, ce qui correspond à 6 % de la surface boisée totale (Fowler *et al.* 1999a). La surface de forêt exposée atteint 6 millions de km² en 1970, soit 18 % de la surface totale de forêt, puis 8 millions de km² soit 24 % en 1990. Selon un scénario réaliste de gestion des émissions, près de la moitié de la surface forestière totale serait susceptible en 2100 de subir des épisodes de concentration critique en ozone (Fowler *et al.* 1999a). Même si de telles prédictions demeurent spéculatives, ces valeurs témoignent de l'importance de la menace que représente la hausse de la concentration en ozone troposphérique pour les écosystèmes forestiers.

III.3. Indices et seuils critiques d'exposition à l'ozone

La mise en évidence des effets négatifs de l'ozone sur la croissance des espèces cultivées et forestières a encouragé la mise au point d'indices permettant de relier les pertes en productivité à l'exposition à l'ozone. Les premiers indices utilisés reposaient sur la détermination d'une moyenne journalière de concentration en ozone calculée pour un intervalle de temps de 8 ou 12 heures de jour. Par la suite, des indices plus pertinents du point de vue biologique et plus performants pour la prédiction des effets de l'ozone ont été utilisés pour établir une relation exposition/réponse (figure 19). Le premier de ces indices correspond à la somme des moyennes horaires de concentration en ozone dépassant un seuil donné, par exemple 60 ppb pour l'indice le plus commun, le SUM06. Une seconde catégorie d'indices, dont le W126, est basée sur la pondération par une fonction sigmoïde de l'ensemble des concentrations horaires en ozone (Fiscus *et al.* 2005). Enfin, les indices de type AOTx (*accumulated dose over a threshold of x ppb*) sont calculés en sommant les différences entre les moyennes horaires de concentration en ozone et une valeur fixe de x ppb, en annulant les termes négatifs (Fuhrer *et al.* 1997). En 1993, l'usage d'un indice de ce type, l'AOT40, a été validé par la Commission Economique pour l'Europe de l'ONU (UNECE) pour l'évaluation des risques liés à l'ozone pour la végétation en Europe (Karenlämpi & Skarby 1996). L'utilisation d'un seuil minimal ou d'une pondération par une fonction sigmoïde reflète la capacité de détoxication de la plante et permet d'éliminer les concentrations horaires en ozone trop faibles pour induire des effets physiologiques. De plus, ce type d'indices présente l'avantage de reposer sur la mesure physique, relativement fiable et

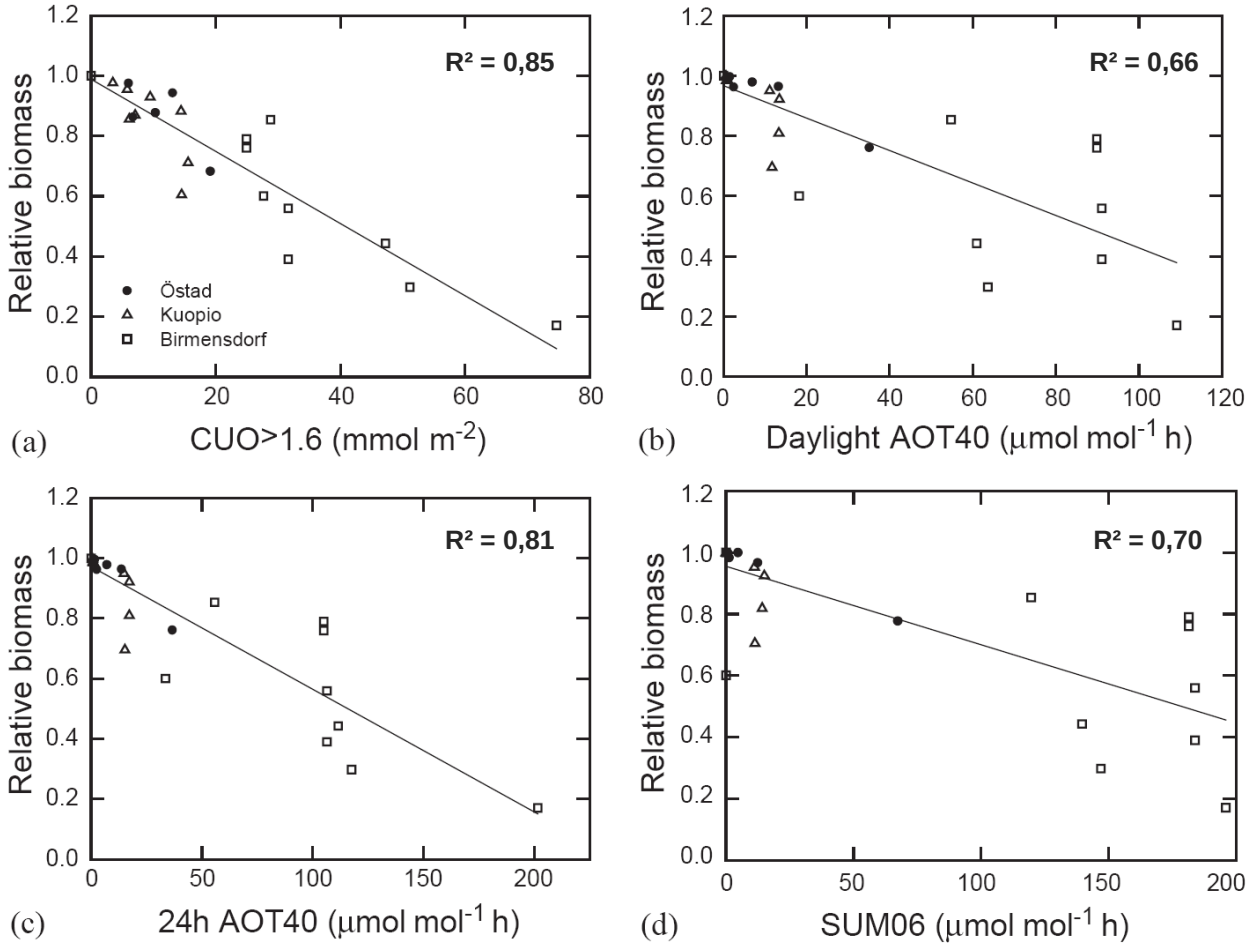


Figure 20 : Relation entre la production de biomasse relative et la dose d'ozone cumulée déterminée par différents indices pour le bouleau (*Betula pendula*).
Indice basé sur le flux stomatique d'ozone (F_{O_3}) :

a) CUO>1,6 = $\Sigma(F_{O_3})$ pour F_{O_3}> 1,6 nmol.m^{-2}.s^{-1}

Indices basés sur la concentration ambiante en ozone :

b) daylight AOT40 = $\Sigma([O_3] - 40)$ pour $[O_3] > 40$ ppb et de jour

c) 24h AOT40 = $\Sigma([O_3] - 40)$ pour $[O_3] > 40$ ppb

d) SUM06 = $\Sigma[O_3]$ pour $[O_3] > 60$ ppb

Le coefficient de corrélation de la relation déterminée pour chaque indice à partir des mêmes données est indiqué.

Source : Uddling *et al*. (2004) *Atmospheric Environment*, **38** : 4709-4719.

aisée, de la concentration ambiante en ozone. Les moyennes horaires calculées selon les modalités relatives à chaque indice sont ensuite cumulées sur un intervalle de temps donné, journée ou saison de végétation, sous la forme d'une dose cumulée exprimée en ppm·h.

À partir de tels indices et d'expériences en OTC, des niveaux critiques correspondant à une exposition à l'ozone susceptible de réduire l'accumulation de biomasse de 10%, ont été définis pour la végétation en Europe (Paoletti & Manning 2007). Pour les céréales, le niveau critique annuel d'exposition correspond à un AOT40 de 3 ppm·h calculé sur une période de trois mois (généralement mai-juillet) et ne prenant en compte que les heures avec un éclairement minimal de 50 $W.m^{-2}$ (Karenlämpi & Skarby 1996). Pour les arbres, le niveau critique d'AOT40 est fixé à 5 ppm·h pour une période de croissance de six mois (généralement avril-septembre) et un éclairement minimal de 50 $W.m^{-2}$ (Karenlämpi & Skarby 1996). Ces niveaux critiques ont été récemment remis en cause pour (i) le faible nombre d'expériences prises en compte (17 pour les céréales et 3 pour les arbres), (ii) le nombre restreint d'espèces étudiées (blé pour les céréales et hêtre pour les arbres), (iii) la grande variabilité des données utilisées (Grünhage & Jager 2003). De plus, certaines études ont montré pour certaines espèces d'arbres de forêt des effets appréciables d'une exposition nocturne à l'ozone (Oksanen & Holopainen 2001).

On s'oriente ainsi depuis quelques années vers la conception d'indices d'exposition basés sur le flux d'ozone entrant dans les tissus foliaires, correspondant à une dose cumulée d'ozone (CUO, *cumulative uptake of ozone*). On parle aussi de flux stomatique cumulé (AF_{st}, *accumulated stomatal flux of ozone*) auquel on peut appliquer un seuil de flux instantané de *x* $nmol.m^{-2}.s^{-1}$ ($AF_{st}x$) qui reflète la capacité de détoxication des tissus foliaires. En prenant en compte la quantité d'ozone réellement au contact des tissus photosynthétiques foliaires, ce type d'indices permet de définir une relation dose/effet plus pertinente d'un point de vue biologique. Comme le montre l'augmentation du coefficient de corrélation R^2 entre biomasse relative et indice d'exposition à l'ozone (figure 20), la performance de ce type d'indice pour prédire les pertes de croissance dues à l'ozone apparaît supérieure à celle de l'AOT40 (Uddling *et al.* 2004). Les relations dose/effet établies pour le blé et la pomme de terre (Pleijel *et al.* 2007) et le bouleau et le hêtre (Karlsson *et al.* 2007) ont permis de définir des seuils critiques d'exposition à l'ozone sous la forme d'une dose cumulée annuelle susceptible de réduire la croissance de 10%. Pour le blé et la pomme de terre, les niveaux critiques annuels correspondent à un $AF_{st}6$ de 1 et 5 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ respectivement. Pour le hêtre et le bouleau, c'est l'indice $AF_{st}1{,}6$ qui s'est montré le plus performant pour expliquer la réduction de croissance et la dose cumulée critique a été évaluée à 4 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ (Paoletti & Manning 2007).

Le calcul des indices de flux stomatique d'ozone repose sur la conductance stomatique pour la vapeur d'eau, dont la mesure en continu reste assez contraignante. Pour pallier à ce problème, la conductance stomatique est calculée plutôt que mesurée grâce à des modèles (Emberson *et*

al. 2000a, Karlsson *et al.* 2004). Ces modèles intègrent un ensemble de paramètres spécifiques de l'espèce étudiée : conductance stomatique maximale et minimale mesurée à intensité lumineuse saturante et évolution de la conductance en fonction de la phénologie des feuilles, de l'intensité lumineuse, de la température et du déficit de pression de vapeur d'eau (Pleijel *et al.* 2007). Ce type de modèle donne accès à la conductance stomatique à partir de variables physiques mesurées en continu sur le terrain, et peut être appliqué à grande échelle.

La capacité de détoxication de la plante est traduite par un seuil de flux instantané appliqué aux indices d'exposition à l'ozone basés sur le flux stomatique. La valeur de ces seuils est déterminée de manière empirique en conservant le seuil fournissant la meilleure corrélation dose/effet. De plus, les résultats obtenus sur quelques espèces seulement sont généralisés à l'ensemble des espèces cultivées ou des arbres. En conséquence, l'amélioration de l'évaluation des risques pour la végétation liés à l'exposition à l'ozone passe par l'élaboration d'indices prenant en compte plus finement la capacité de détoxication et la réponse du métabolisme cellulaire et leurs variations interspécifiques (Tausz *et al.* 2007, Wieser & Matyssek 2007, Paoletti & Manning 2007).

IV. Mécanismes d'action de l'ozone à l'échelle cellulaire

IV.1. Diffusion dans les tissus foliaires

Le transfert entre l'atmosphère et la végétation des polluants gazeux tels que l'ozone s'opère principalement par transfert turbulent, les processus moléculaires n'intervenant qu'à une distance inférieure à 1 mm des surfaces (Fowler *et al.* 1999a). Les mouvements de turbulence dans les couches d'air proches de la surface terrestre proviennent de la traînée de frottement associée à cette surface. Les couverts forestiers, qui forment des surfaces très irrégulières, génèrent une traînée de frottement importante, ce qui amplifie l'effet de turbulence. Le taux de transfert turbulent entre l'atmosphère et les forêts est ainsi dix fois supérieur à celui observé au dessus des couverts plus réguliers (prairies, champs), ce qui fait des forêts un puits de dépôt important pour les polluants atmosphériques (Fowler *et al.* 1999a). Lorsqu'un mouvement turbulent de l'air amène l'ozone à proximité de la surface foliaire, la première résistance rencontrée est la résistance relativement faible de la couche limite, qui varie en fonction de la surface de la feuille et de l'agitation de l'air (vent, turbulence). Avant de pénétrer dans les tissus foliaires, l'ozone rencontre ensuite deux résistances *en dérivation*, la résistance associée à la cuticule et celle associée aux stomates (figure 21). La cuticule représente une barrière quasi-absolue à la diffusion des gaz (Müller & Riederer 2005). *In vitro*, les cires épicuticulaires se

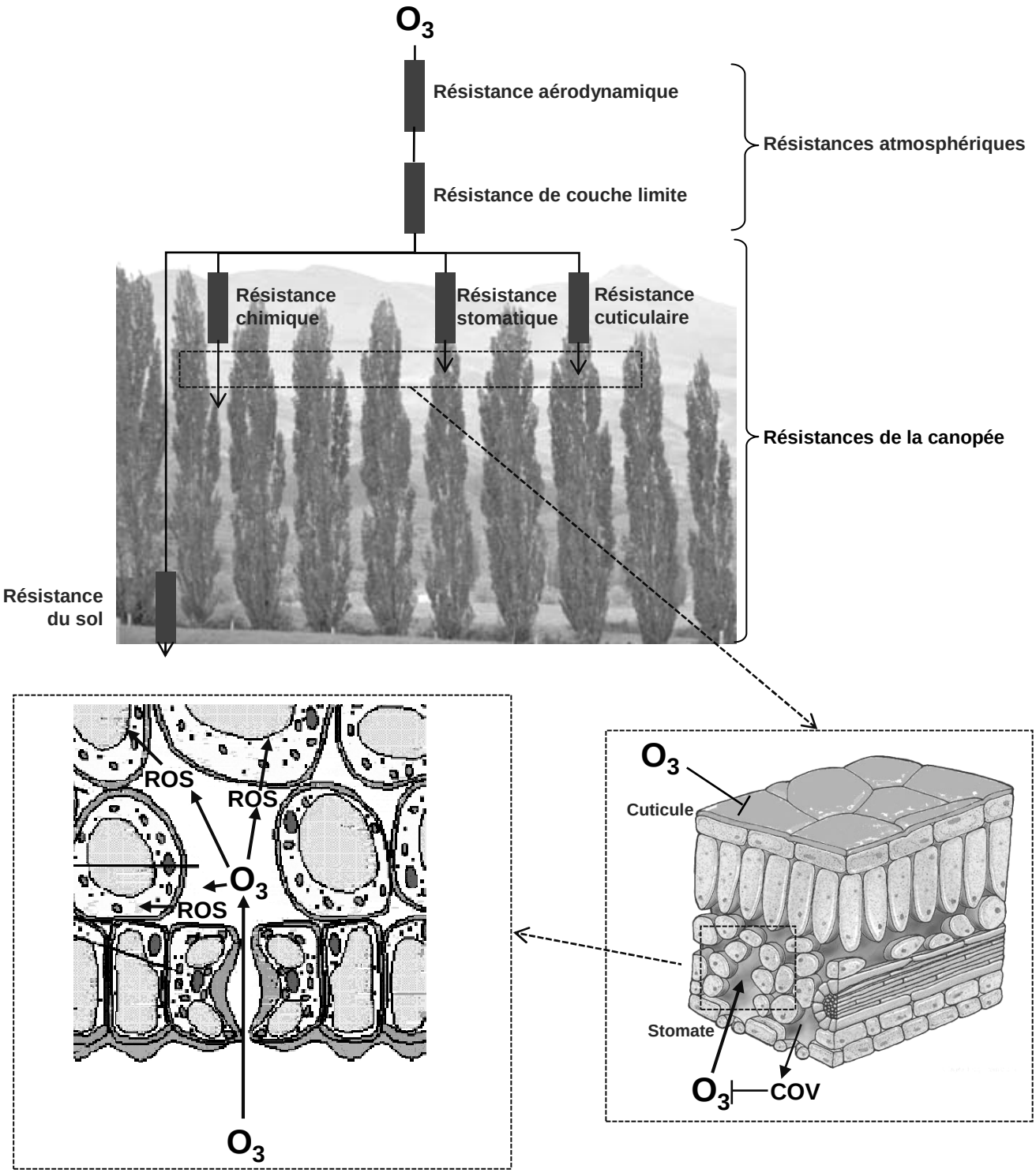


Figure 21 : Diffusion de l'ozone depuis l'atmosphère jusqu'au mésophylle.

D'après Fowler *et al*. (1999) *Water, Air and Soil Pollution*, **116** : 5-32.

montrent ainsi particulièrement résistantes à l'ozone (Jetter *et al.* 1996, Vanhatalo *et al.* 2001) et le flux à travers la cuticule est en conditions naturelles au minimum 10000 fois plus faible que le flux stomatique (Kerstiens & Lendzian 1989). Par conséquent, la diffusion de l'ozone dans les tissus foliaires repose presque exclusivement sur les échanges gazeux stomatiques. Malgré la masse moléculaire supérieure, et donc la diffusivité plus faible, de l'ozone par rapport à la vapeur d'eau, le polluant diffuse sans difficulté dans la cavité sous-stomatique.

IV.2. Réactions dans l'apoplasme

Dans l'apoplasme, les processus moléculaires deviennent prépondérants et l'ozone peut s'y décomposer selon trois modalités. Il peut d'abord réagir en phase gazeuse avec des composés émis par la plante comme l'éthylène, le monoxyde d'azote ou des composés organiques volatils. Parmi les COV, l'isoprène est émis par la plupart des arbres et se montre particulièrement réactif vis-à-vis de l'ozone (Sharkey & Yeh 2001). En éliminant une partie de l'ozone avant que celui-ci n'entre en contact avec les tissus, l'isoprène pourrait jouer un rôle antioxydant (Loreto *et al.* 2001), dont le bénéfice semble atténué par les coûts métaboliques importants associés à sa biosynthèse et l'implication des COV dans la formation de l'ozone troposphérique (Fiscus *et al.* 2005). Des travaux récents renforcent néanmoins l'hypothèse d'un rôle bénéfique de l'isoprène dans la résistance des plantes à l'ozone (Loreto & Fares 2007). La réactivité des monoterpènes, COV majoritairement émis par les céréales, vis-à-vis de l'ozone a été moins étudiée mais des analogies sont possibles (Fiscus *et al.* 2005). L'éthylène et le monoxyde d'azote émis sont tous deux capables également de réagir avec l'ozone, mais leur faible taux d'émission leur confère un rôle dans la signalisation plutôt que dans la détoxication directe.

Si la concentration des composés volatils n'est pas suffisante pour éliminer la totalité de l'ozone, ce dernier réagit en phase liquide au niveau de l'interface entre espaces intercellulaires et paroi cellulaire, dans la paroi cellulaire elle-même et au contact de la membrane plasmique. La réaction de l'ozone avec diverses molécules de l'apoplasme (eau, protéines, cellulose, etc.) entraîne la formation de ROS qui peuvent à leur tour attaquer la membrane plasmique. L'action antioxydante de l'ascorbate, présent à des concentrations appréciables dans l'apoplasme, contribue en grande partie à la capacité de détoxication de ce compartiment (Smirnoff & Wheeler 2000). A ce titre, l'ascorbate est généralement considéré comme la première ligne de défense contre l'ozone (Polle *et al.* 1995). Si la capacité antioxydante apoplastique est dépassée, l'ozone et les ROS dérivées réagissent avec la membrane plasmique.

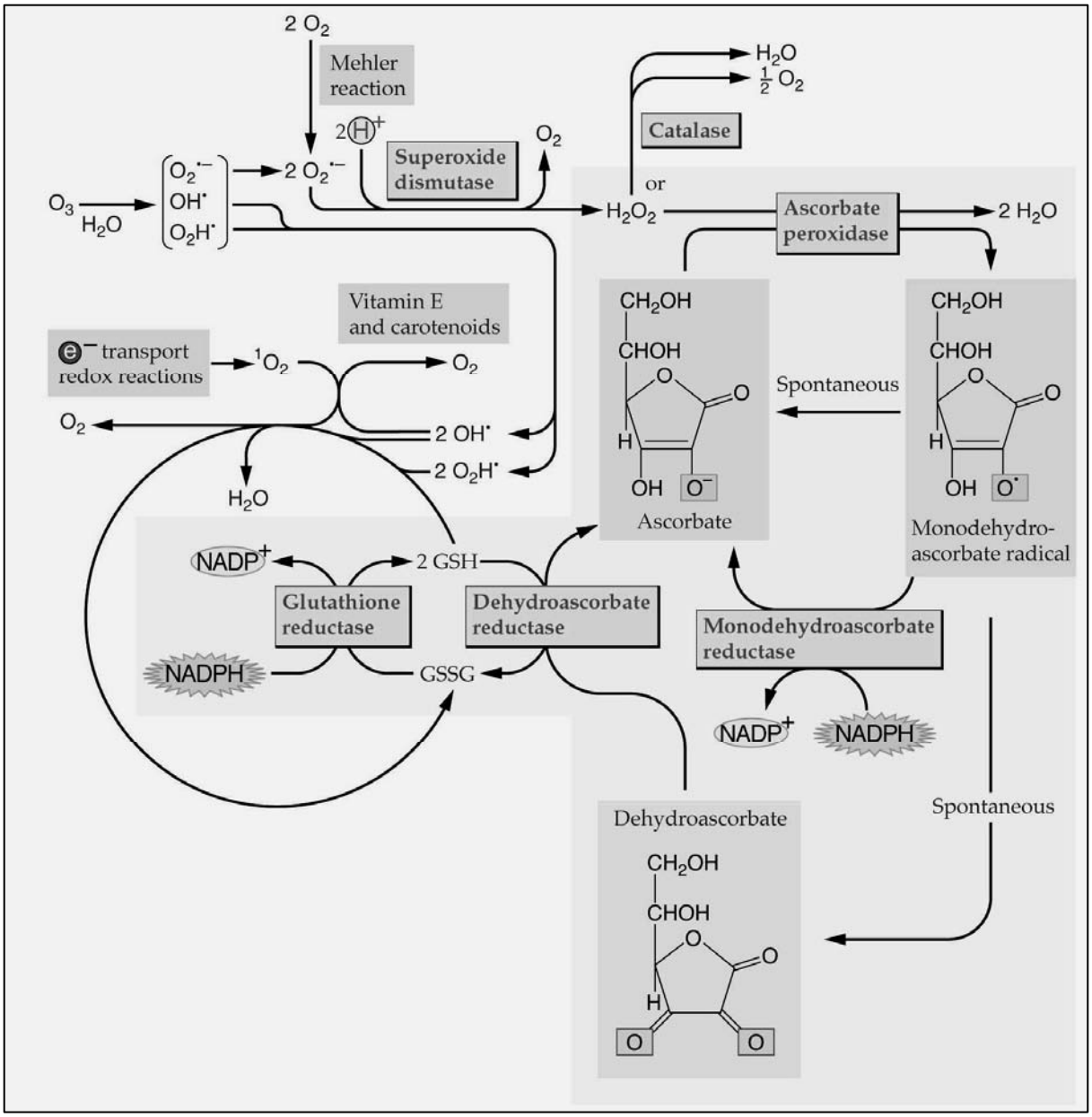


Figure 22 : Système antioxydant cellulaire.
Les espèces oxygénées réactives (ROS) dérivées de l'ozone (anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, radical hydroxyle $HO^{\cdot}$, radical perhydroxyle $HO_2^{\cdot}$ et peroxyde d'hydrogène H_2O_2) et issues de la photochimie (oxygène singulet $^1O_2$) sont pris en charge par des composés non enzymatiques (ascorbate, glutathion, α-tocophérol ou vitamine E, caroténoïdes) et par l'activité de diverses enzymes (SOD, catalase, APX, MDHAR, DHAR, GR). Le cycle de Halliwell-Asada-Foyer figure en grisé dans la partie droite du schéma.

Source : Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones Eds.
© 2000, American Society of Plant Physiologists

IV.3. Stress oxydatif cellulaire

L'atteinte de la membrane plasmique, en particulier par la peroxydation des lipides polyinsaturés membranaires, constitue une étape critique de l'exposition à l'ozone pour la cellule. D'une part, cette étape initie la propagation du stress oxydatif vers l'intérieur de la cellule. D'autre part, elle représente le point de départ de plusieurs voies de signalisation potentielles (figure 22) (Baier *et al.* 2005). Dans leur ensemble, les effets physiologiques de l'ozone sur les plantes proviennent à la fois de la cytotoxicité directe des ROS et des réponses de la cellule déclenchées par les voies de signalisation faisant intervenir ces mêmes ROS (Foyer & Noctor 2005).

Dans le cytosol, le stress oxydatif généré par l'ozone est limité plus ou moins efficacement par le système antioxydant cellulaire, dont la principale composante est le cycle de Halliwell-Asada-Foyer (Noctor & Foyer 1998). Ce cycle débute dans l'apoplasme ou dans le cytosol par la réduction des ROS par l'ascorbate, lui-même oxydé en déhydroascorbate (DHA) (figure 22). Dans le cytosol, l'ascorbate est régénéré par une enzyme, la DHA réductase, qui utilise le glutathion réduit (GSH) en tant que donneur d'électrons. Le glutathion réduit est à son tour régénéré par la glutathion réductase au prix de l'oxydation d'une molécule de NADPH issue des processus photochimiques et cataboliques. Le système antioxydant comprend de plus diverses enzymes capables de prendre en charge les ROS. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réduction de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), lui-même réduit par différentes peroxydases (catalase, ascorbate peroxydase, glutathion peroxydase) (Pell *et al.* 1997). Enfin, divers composés secondaires sont également capables de réduire les ROS : α-tocophérol (ou vitamine E), polyamines, xanthophylles.

Le système antioxydant dans son ensemble a pour fonction de maintenir le niveau de ROS sous un seuil de cytotoxicité. Si le rapport entre capacité antioxydante et ROS penche en la faveur de ces derniers, l'équilibre redox est rompu et l'homéostasie de la cellule est menacée. De plus, le fonctionnement du système antioxydant et la synthèse de ses composants, enzymatiques ou non, reposent pleinement sur la production d'énergie (ATP) et de pouvoir réducteur (NAD(P)H) par le métabolisme cellulaire et implique des coûts métaboliques importants.

IV.4. Déclenchement de la mort cellulaire

Chez certaines espèces, l'exposition à l'ozone conduit à l'apparition de symptômes foliaires sans que la photosynthèse ne soit touchée à l'échelle de la plante entière. Ces dommages visibles présentent l'aspect de tâches chlorotiques ou nécrotiques semblables aux lésions associées à la réponse d'hypersensibilité observée lors d'une réaction d'incompatibilité entre une plante et un pathogène (Langebartels *et al.* 2002). Chez ces espèces, l'ozone

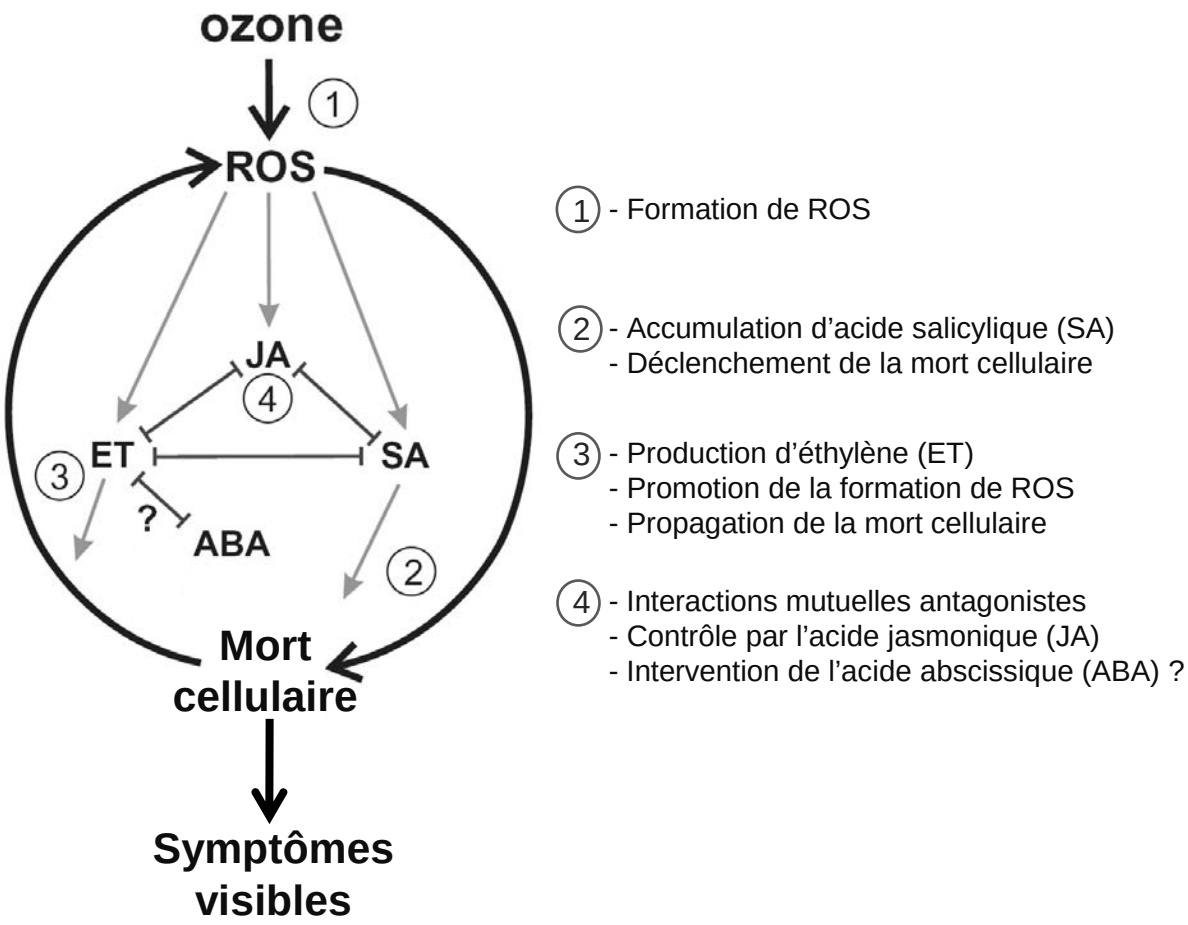


Figure 23 : Modèle du processus de *mort cellulaire oxydative* provoquée par l'ozone. Rôle des espèces oxygénées réactives (ROS) et des phytohormones.

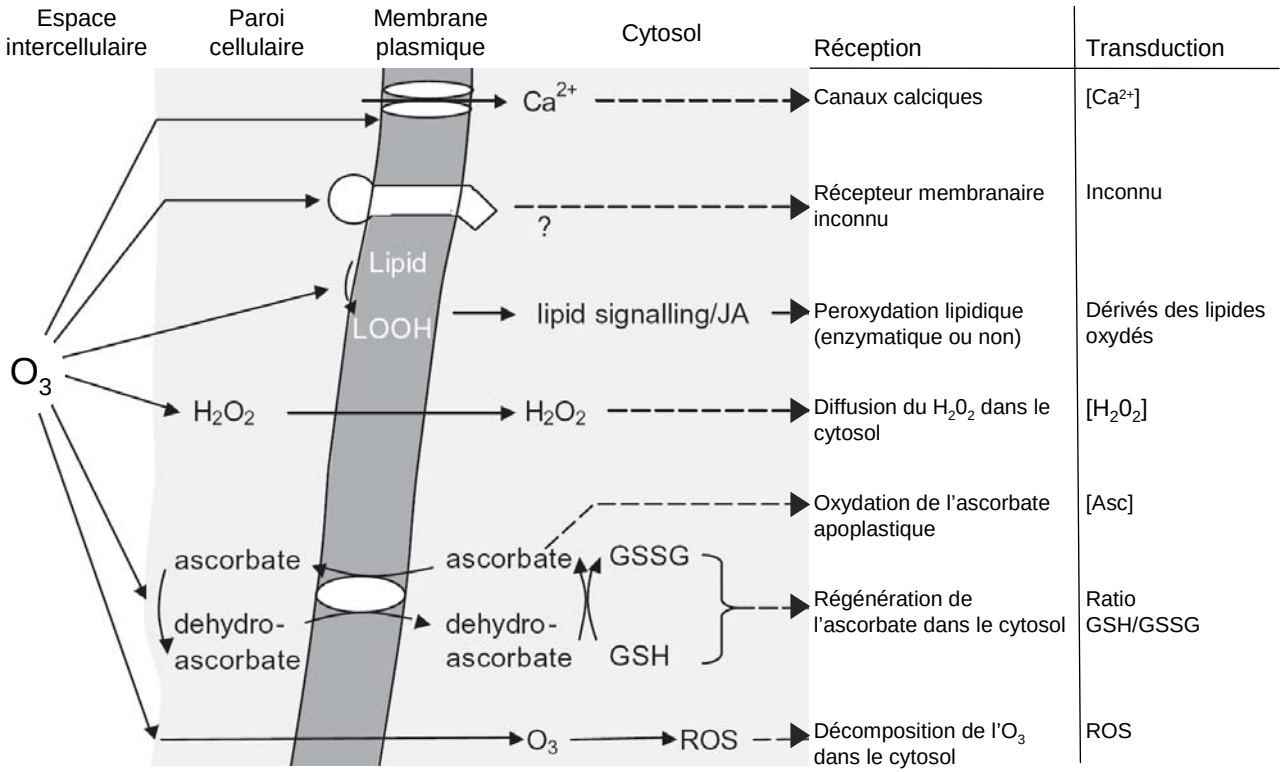
D'après Kangasjärvi et al. (2005) *Plant, Cell and Environment*, **28** : 1021-1036.

déclenche un ensemble d'événements communs à la réponse d'hypersensibilité (HR) : induction d'un pic oxydatif apoplastique (*oxidative burst*), accumulation de composés phénoliques, synthèse de protéines de type PR (*pathogenesis-related*) et apparition de zones nécrotiques (Overmyer *et al.* 2003). Le processus de *mort cellulaire oxydative* commun à la réaction d'incompatibilité plante/pathogène et à la réponse à l'ozone chez certaines espèces fait intervenir les ROS, le monoxyde d'azote, les dérivés de la peroxydation lipidique et des phytohormones (acide salicylique et éthylène) dans une boucle d'amplification qui entraîne la propagation de la mort cellulaire, tandis que deux autres phytohormones (acide jasmonique et acide abscissique) limitent quant à elles la progression du cycle (figure 23) (Kangasjärvi *et al.* 2005). Cette stratégie de la *terre brûlée* a pour but de restreindre le développement du pathogène dans les tissus foliaires. De plus, la réaction de type HR induit la mise en place d'une résistance locale et systémique (Langebartels *et al.* 2002). Dans le cas de l'exposition à l'ozone, le bénéfice pour la plante de la formation de zones nécrotiques apparaît moins évident, si bien que l'on considère que l'apparition de symptômes de type HR en réponse à l'ozone résulte du déclenchement fortuit par le polluant d'un ensemble de processus dédiés normalement à la réponse à un stress biotique. L'action de l'ozone est ainsi devenue un modèle d'étude de la mort cellulaire programmée chez les plantes (PCD) et de l'implication des ROS dans le déclenchement et la modulation de ce phénomène (Rao *et al.* 2000).

IV.5. Réponses cellulaires à une exposition chronique

Le développement de lésions foliaires nécrotiques est généralement associé à une exposition aiguë à l'ozone. Une exposition chronique à des niveaux modérés d'ozone est néanmoins capable de causer un ensemble d'effets négatifs sur la physiologie de l'arbre. Ces effets, décrits dans la partie III.2., proviennent d'une part de dommages oxydatifs directs et d'autre part de modifications de l'expression des gènes en réponse à des signaux transmis notamment par les ROS. S'il est difficile de discerner la part respective de ces deux modalités, la régulation de l'expression des gènes joue sans doute un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à l'ozone, comme en témoigne la stimulation de la transcription de gènes codant pour des enzymes participant au métabolisme secondaire (PAL, SHDH, STS, PMT, CHS), au catabolisme (PEPc) ou à la détoxication (APX, GST). La modulation de l'expression des gènes en réponse à l'ozone met en jeu plusieurs voies de signalisation possibles, comportant chacune un récepteur et un médiateur du signal associé à la présence d'ozone (figure 24) (Baier *et al.* 2005). Ces différentes voies peuvent fonctionner simultanément et en interconnexion, ce qui rend la compréhension de ces mécanismes d'autant plus difficile.

A.



B.

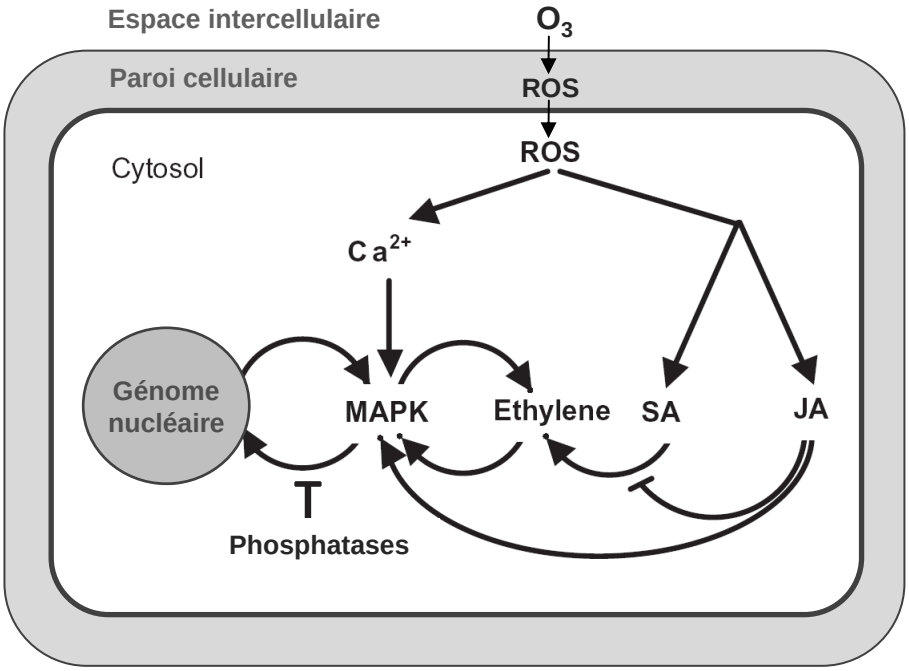


Figure 24 : **A.** Voies potentielles de signalisation cellulaire associée à la présence d'ozone dans l'apoplasme. **B.** Rôles et interactions possibles des ROS, des hormones, des MAP kinases et des phosphatases lors de la transduction du signal *ozone* vers le génome nucléaire.

D'après Baier et al. (2005) *Plant, Cell and Environment*, **28** : 1012-1020.

V. Interactions avec d'autres facteurs environnementaux

En milieu naturel, les effets de l'ozone sur la végétation interagissent avec de multiples facteurs. De plus, l'augmentation à long terme de la concentration en ozone troposphérique s'inscrit dans le contexte de changements climatiques globaux.

V.1. Augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique

La hausse de la consommation de combustibles fossiles entraîne l'augmentation simultanée des émissions de CO_2 et des précurseurs de l'ozone (NO_x et COV). Depuis l'ère préindustrielle, la concentration en CO_2 dans la troposphère a augmenté de 35 % tandis que la teneur en ozone a presque doublé. La teneur en CO_2 est ainsi passée d'environ 280 ppm avant l'ère industrielle à 380 ppm aujourd'hui et pourrait atteindre 500 à 1000 ppm en 2100 selon les différents scénarii de gestion des émissions (IPCC 2007). Chez les plantes en C3, l'accroissement de la concentration en CO_2 stimule la photosynthèse tout en réduisant la conductance stomatique, ce qui entraîne une augmentation de l'efficience d'utilisation de l'eau et de la productivité. La plupart des expériences d'exposition simultanée aux deux polluants indique une atténuation des effets de l'ozone par le CO_2 élevé (figure 25) (Saxe 2002, Fiscus *et al.* 2005, Wittig *et al.* 2007). Concernant les arbres, les effets opposés des deux polluants ont notamment été observés en OTC pour le chêne, le hêtre, le pin sylvestre (Broadmeadow & Jackson 2000), ou le peuplier hybride (Gardner *et al.* 2005), ainsi qu'en système FACE (*Free-Air CO_2 Enrichment*) pour le tremble et le bouleau (Karnosky *et al.* 2003). La protection apportée par l'enrichissement en CO_2 pourrait provenir de la stimulation de l'activité photosynthétique, qui permettrait de soutenir les processus de détoxication (Sehmer *et al.* 1998) et la synthèse de l'ascorbate (Tausz *et al.* 2007). Néanmoins, l'effet positif du fort CO_2 sur le système antioxydant reste incertain (Tausz *et al.* 2007). La protection contre les effets de l'ozone paraît plutôt résulter de la réduction de la conductance stomatique en réponse à un C_i élevé, ce qui limiterait la diffusion de l'ozone dans les tissus foliaires (Paoletti & Grulke 2005). Il faut cependant rappeler que la stimulation de la photosynthèse peut ne pas se maintenir sur la durée (Jacob *et al.* 1995) et que l'effet *fertilisant* du fort CO_2 varie selon les espèces, la fertilité du sol et l'âge des forêts (Karnosky *et al.* 2007). En ce sens, certaines expériences ont montré des effets négatifs de l'interaction entre les deux polluants (Karnosky *et al.* 2007). A long terme, la hausse de la concentration en CO_2 ne pourra limiter les effets négatifs de l'ozone que si l'impact positif du fort CO_2 se maintient sur la durée, ce qui reste à démontrer (Paoletti & Grulke 2005). En termes de gestion des émissions et de protection des écosystèmes, il convient plutôt de considérer que l'augmentation de la concentration en ozone troposphérique est susceptible d'annuler tout bénéfice potentiel de la hausse de la concentration en CO_2. En particulier, les effets négatifs de

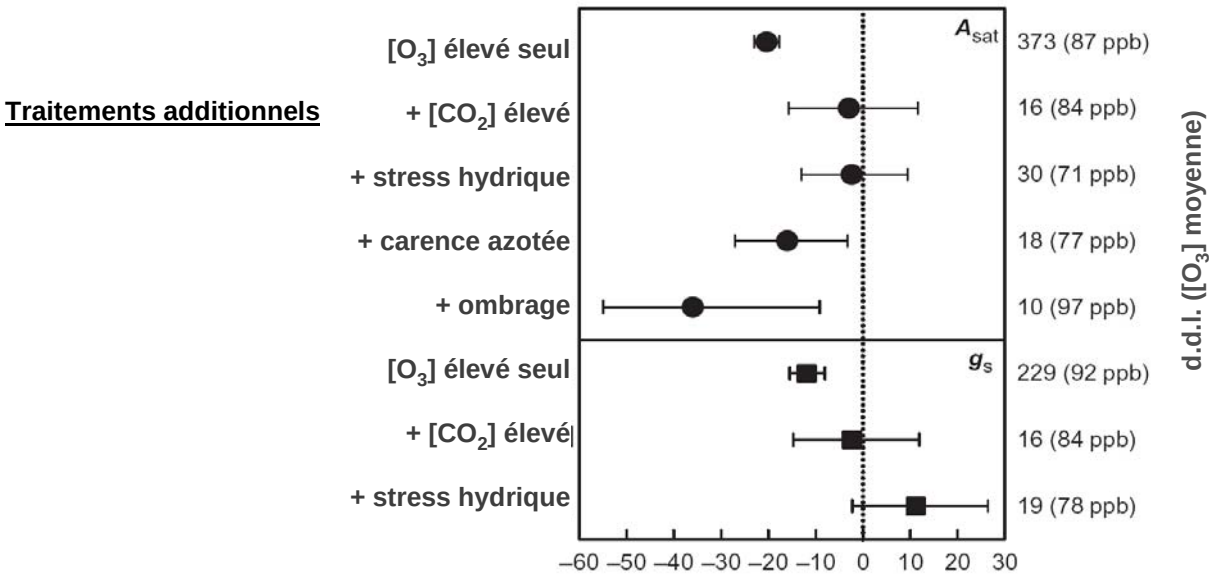


Figure 25 : Effets d'une concentration élevée en ozone, seule ou en combinaison avec d'autres traitements, sur l'assimilation de CO_2 à intensité lumineuse saturante (A_{sat}) et la conductance stomatique (g_s) des arbres : méta-analyse de 61 (A_{sat}) et 55 (g_s) études publiées. La réponse de ces deux paramètres est déterminée à partir du rapport moyen entre les valeurs rapportées pour les plants traités par rapport à celles mesurées pour les plants témoins. Chaque point correspond au pourcentage de variation dans les plants traités par rapport aux plants témoins avec l'intervalle de confiance à 95% correspondant. La réponse au(x) traitement(s) est considérée comme significative si l'intervalle de confiance ne couvre pas l'axe des ordonnées. Le degré de liberté (d.d.l.) pour chaque valeur est indiqué à droite et la concentration moyenne en ozone associée est notée entre parenthèses.

Source : Wittig *et al*. (2007) *Plant, Cell and Environment*, **30**, 9 : 1150-1162.

l'ozone sur les arbres forestiers compromettent la capacité de séquestration du carbone par les forêts dans une atmosphère enrichie en CO_2 (Beedlow *et al.* 2004).

V.2. Sécheresse

Dans la mesure où des températures élevées et un fort rayonnement solaire constituent des facteurs favorisant la formation de l'ozone troposphérique, les épisodes de sécheresse et de pollution à l'ozone sont souvent associés en milieu naturel. *A priori*, l'interaction entre ces deux stress abiotiques apparaît simple : la fermeture stomatique induite par le déficit hydrique limite le flux d'ozone entrant dans les tissus foliaires et les dommages dus au polluant. La méta-analyse proposée par Wittig *et al.* (2007) semble corroborer cette présomption puisque l'effet négatif de l'ozone sur la photosynthèse est réduit pour les arbres soumis à un stress hydrique (figure 25). De la même façon, l'épisode de sécheresse prolongée de 2003 en Europe aurait occulté les effets de l'ozone sur le hêtre (Löw *et al.* 2006). Cependant, la réduction de la conductance stomatique ne peut pas expliquer à elle seule les effets observés sur le terrain et des interactions plus complexes apparaissent dans la plupart des cas. L'ozone peut induire des effets directs sur les stomates et entraîne un ralentissement de leur capacité de réaction aux variations de l'environnement (Pearson & Mansfield 1993), ce qui affecte la capacité de la plante à contrôler ses pertes en eau et peut amplifier les effets du stress hydrique (Paoletti & Grulke 2005). La mobilisation du système antioxydant étant une réponse commune à la sécheresse et à l'ozone, des mécanismes de protection croisée pourraient être envisagés. Des épicéas soumis à un stress hydrique se sont ainsi montrés plus résistants à une exposition ultérieure à l'ozone (Kronfuss *et al.* 1998). Toutefois, des effets additifs des deux contraintes ont été relevés chez le sapin de Douglas et le peuplier (Saxe 2002). Il est donc difficile d'établir si le stress oxydant associé au stress hydrique renforce la capacité de défense contre l'ozone en activant le système antioxydant, ou s'il contribue à l'affaiblir en exerçant une pression supplémentaire (Tausz *et al.* 2007). De manière générale, les interactions entre ozone et sécheresse, qui affectent à la fois les stomates et le système antioxydant, sont complexes et dépendent en grande partie de la distribution temporelle des épisodes d'ozone et de sécheresse (Matyssek *et al.* 2006).

V.3. Dépôts azotés

À partir des années 1970, le dépérissement des forêts a attiré l'attention sur le phénomène des pluies acides et d'acidification des sols, dont les émissions sulfurées ont été identifiées comme principale cause. Des mesures de restriction de ce type d'émissions ont assez vite porté leurs fruits en Europe et en Amérique du Nord mais les phénomènes locaux de dépérissement des forêts ont persisté. Il s'est alors avéré que les dépôts azotés contribuaient de

manière significative à l'acidification des sols à l'origine de ce phénomène (Fowler *et al.* 1999a). Les dépôts azotés (NH_x et NO_y) proviennent des émissions anthropiques issues de l'utilisation d'engrais synthétiques (NH_x) et de la combustion de carburants fossiles (NO_y) (Felzer et al. 2007). L'intensification des activités humaines associées à l'agriculture intensive, aux transports et à l'industrie a provoqué une hausse considérable des apports en formes azotées assimilables par les organismes vivants. Les forêts tempérées, généralement proches des sources des émissions azotées, sont particulièrement exposées, d'autant plus que, contrairement aux agroécosystèmes hyper fertilisés, l'azote constitue un facteur limitant leur productivité (Felzer et al. 2007). Les dépôts azotés provoquent une acidification des sols qui est à l'origine du dépérissement de certaines forêts sensibles du fait de leur assise géologique. C'est le cas de certaines zones du massif forestier des Vosges, touchées par un dépérissement dit magnésique, caractérisé par une carence en magnésium chez les arbres atteints (Dambrine *et al.* 1998). Les apports azotés peuvent aussi causer, par acidification des sols et par eutrophisation des écosystèmes forestiers, une perte de biodiversité des communautés végétales, animales et de microorganismes. Malgré la persistance des phénomènes locaux de dépérissement des forêts, la productivité globale des écosystèmes forestiers tempérés et boréaux augmente continuellement depuis plusieurs décennies. Les causes potentielles de cette hausse de la production de biomasse sont (i) l'augmentation de la température qui allonge la période annuelle de croissance, (ii) l'augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique qui stimule la photosynthèse et (iii) l'augmentation des dépôts azotés qui fertilise les sols (Fowler *et al.* 1999a). Parmi les composés azotés (NH_x et NO_y) responsables de ce type de dépôts, les NO_y regroupent les oxydes d'azotes NO_x ainsi que les dérivés de son oxydation, tels que l'acide nitrique (HNO_3^-) et le nitrate de peroxyacétyle (PAN). Les NO_x, qui contribuent à plus de la moitié des dépôts azotés, participent à la formation de l'ozone, si bien que la distribution géographique des deux types de polluants est assez proche. En particulier, les régions où les concentrations en ozone sont les plus fortes (Europe, Nord-Est des Etats-Unis et Est de la Chine) connaissent les dépôts azotés les plus importants (Felzer et al. 2007). Si la coïncidence des deux types de pollution apparaît fréquente en milieu naturel, leurs interactions restent assez méconnues. Un traitement au dioxyde d'azote (NO_2) seul stimule la croissance de plants de blé, de radis et de haricot, mais lorsqu'il précède un traitement à l'ozone, les effets négatifs de l'ozone sont amplifiés pour le blé et le radis, et atténués pour le haricot (Runeckles & Palmer 1987). On estime que l'effet positif des NO_x sur la croissance des végétaux provient de la fertilisation du sol, mais l'assimilation du NO_2 par les stomates peut entraîner des effets physiologiques plus directs. Ainsi, des plants de tabac exposés au NO_2 affichent un doublement de nombreux paramètres de croissance (biomasse, surface foliaire, contenu en acides aminés, en protéines et en micro- et macroéléments) sans que l'azote provenant du NO_2 fumigé ne soit incorporé à la biomasse accumulée (Takahashi et al. 2005). Dans ce cas, le NO_2 atmosphérique constituerait un signal

de croissance. Dans d'autres expériences, le flux stomatique de NO_2 altère le contrôle stomatique des plants traités et donc leur capacité de gestion des pertes en eau (Felzer et al. 2007). A l'échelle des écosystèmes, la fertilisation des sols par les dépôts azotés pourrait augmenter la capacité de séquestration du carbone des forêts tempérées en stimulant leur accumulation de biomasse. A ce titre, les dépôts azotés pourraient compenser les effets négatifs de l'ozone sur la croissance des arbres des forêts tempérées. La contribution de l'effet fertilisant des dépôts azotés à la capacité de séquestration du carbone repose sur la proportion de l'azote des NO_y assimilé et intégré à la biomasse. Même si cette proportion varie de 5% (Nadelhoffer *et al.* 1999) à 13% (Felzer et al. 2007) selon les modèles utilisés, l'effet fertilisant des dépôts azotés semble suffisant pour compenser les effets négatifs de l'ozone sur la capacité de séquestration des forêts tempérées (Felzer et al. 2007). Ces simulations doivent être toutefois modérées par les conclusions du programme HF-LTER (Harvard Forest Long-term Ecological Research) portant sur l'étude des effets à long terme des dépôts azotés sur une forêt tempérée mixte. Après 15 ans d'amendement azoté, une réduction de biomasse a été mesurée chez des pins rouges, qui ont été touchés ainsi que des érables rouges par une mortalité importante (Magill et al. 2000). Dans ce cas, l'effet fertilisant des dépôts azotés est dominé par leurs effets toxiques. A long terme, l'augmentation des émissions azotées, NO_x en particulier, pourrait poser le double problème de leur toxicité directe par acidification des sols et de l'accroissement de la formation d'ozone.

V.4. Changement climatique global, ozone troposphérique et végétation

Plusieurs facteurs intervenant dans les changements climatiques actuels ont pour origine commune l'accroissement des émissions anthropiques de CO_2, d'oxydes d'azote et de COV. Les oxydes d'azote, responsables de dépôts azotés, sont aussi à l'origine de la formation de l'ozone en association avec les COV. L'ozone troposphérique contribue, avec le CO_2 et le méthane, au forçage radiatif qui entraîne le renforcement de l'effet de serre et l'augmentation de la température de l'atmosphère. Enfin, CO_2, ozone, dépôts azotés et température sont tous susceptibles d'affecter la croissance des végétaux. L'impact de l'ozone sur la végétation s'inscrit donc dans un contexte de changement climatique global caractérisé par l'interaction de multiples facteurs environnementaux. Cependant, cette constatation mène souvent à considérer que l'impact des uns (CO_2, dépôts azotés) pourraient compenser celui des autres (ozone), ce qui revient à minimiser la menace encourue par les écosystèmes. Les données dont on dispose aujourd'hui montrent au contraire qu'une gestion mesurée des émissions anthropiques est impérative. Une telle gestion passe nécessairement par la modification du mode de vie des sociétés humaines dites *développées*.

PROBLÉMATIQUE

PROBLÉMATIQUE

I. Contexte scientifique local

L'unité mixte de recherche INRA / UHP Nancy 1 *Ecologie et Ecophysiologie Forestières* s'attache à étudier les bases physiques et biologiques des interactions entre les facteurs de l'environnement et le fonctionnement des arbres et des écosystèmes forestiers. Dans ce contexte, l'équipe *Ecophysiologie cellulaire et moléculaire* se consacre à l'étude de l'impact des facteurs environnementaux tels que le CO_2 élevé, l'ozone ou la sécheresse sur le métabolisme primaire et secondaire des arbres forestiers. L'utilisation d'un dispositif de fumigation permet d'exposer des plantes en conditions contrôlées à des concentrations variables en ozone et en CO_2, en combinaison ou non. Concernant l'ozone, le travail déjà réalisé au sein de cette équipe a permis de mettre en évidence un certain nombre d'effets marquants d'une exposition chronique sur les arbres, notamment la stimulation de l'enzyme malique à NAD chez le pin d'alep (Gérant *et al.* 1996), la stimulation du système antioxydant chez l'épicéa (Sehmer *et al.* 1998), l'inhibition de l'expression de la rubisco et de la rubisco activase (Pelloux *et al.* 2001) et le comportement opposé de la PEPc chez le pin alep (Fontaine *et al.* 1999, 2003), la stimulation de l'expression de l'alternative oxydase (AOX) mitochondriale (Dizengremel 2001) et de la synthèse de lignines condensées (Cabané *et al.* 2004) chez le peuplier, ou encore, pour ce même modèle, des modifications du protéome (Bohler *et al.* 2007). Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans une même démarche et contribue à l'étude de l'impact de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire du peuplier.

II. Contexte scientifique global

II.1. Modèle biologique

En plus de son importance sylvicole, le peuplier propose un certain nombre d'avantages pour l'expérimentation : croissance rapide, possibilité de transformation génétique et aptitude à la propagation végétative (Taylor 2002). La publication et l'annotation du génome de *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.* 2006) a renforcé l'intérêt de l'utilisation du peuplier comme modèle biologique des ligneux. Au sein de notre équipe, le choix du modèle biologique s'est porté sur un

peuplier hybride *Populus canescens* (*P. tremula* x *alba*, clone INRA 717-1 B4). En plus des avantages cités auparavant, ce clone montre une aptitude particulière à la transformation qui offre de nombreuses perspectives de recherche. Des transformants de ce clone montrent l'expression ectopique de gènes d'*Escherichia coli* codant pour la glutathion synthétase (GSS) et la glutathion réductase (GR) (Foyer *et al.* 1995), d'un gène d'*Arabidopsis thaliana* codant pour une isoforme chloroplastique de superoxyde dismutase à centre Fe-S (Fe-SOD) (Arisi *et al.* 1998) et d'un gène de pin codant pour une isoforme cytosolique de la glutamine synthétase (GS1) (Gallardo *et al.* 1999). De plus, la sensibilité à l'ozone des espèces de peupliers et de leurs hybrides se montre relativement élevée, ce qui permet d'envisager des réponses significatives à l'échelle de la plante entière malgré la durée limitée des expériences menées. La sensibilité marquée du peuplier par rapport à d'autres espèces d'arbres caducifoliés est associée à sa croissance continue (Polle *et al.* 2001) et rapide (Bortier *et al.* 2000b).

II.2. Type d'exposition à l'ozone

Les études menées sur les effets de l'ozone sur les plantes mettent en jeu deux types d'exposition : aiguë ou chronique. L'exposition aiguë consiste à appliquer une concentration en ozone élévée, supérieure à 200 ppb, pendant une période relativement courte, d'une durée de quelques minutes à quelques heures. Ce type d'expérience met en jeu des concentrations en ozone très rarement mesurées en milieu naturel mais se révèle précieux dans l'étude des réponses à court terme et des voies de signalisation associées. De tels protocoles sont particulièrement utilisés pour l'étude du phénomène de *mort cellulaire oxydative* (voir par exemple Overmyer *et al.* 2005). Les expériences d'exposition chronique recourent quant à elles à des teneurs en ozone plus faibles mais appliquées sur des périodes relativement longues. Dans les expériences en OTC (*open-top chambers*, chambres à ciel ouvert) ou en FACE (*Free-Air CO_2 enrichment*, fumigation à l'air libre), la concentration en ozone utilisée est souvent basée sur un enrichissement modéré de l'air ambiant. La durée de la période de traitement peut varier de quelques semaines à plusieurs années : de 15 jours à 60 ppb pour le peuplier (Guidi *et al.* 2001) ou 30 jours à 70 ppb pour le hêtre (Bortier *et al.* 2000a) jusqu'à trois saisons de végétation à 50 et 100 ppb pour l'épicéa (Leverenz *et al.* 1999). Ce type d'étude vise à exposer les plantes à des teneurs en ozone *réalistes*, c'est-à-dire observées en milieu naturel ou prédites dans un avenir plus ou moins proche. Il permet de mettre en évidence des réponses physiologiques à plus long terme, en interaction ou non avec d'autres facteurs environnementaux. C'est dans cette démarche que s'inscrit notre étude. Pour le travail présenté dans ce mémoire, des peupliers juvéniles ont été soumis à une concentration de 120 ppb pendant 35 jours, ce qui correspond à

une exposition chronique à une concentration en ozone deux à trois fois supérieure au niveau de base actuel.

II.3. Stade de développement des arbres

Le dispositif de fumigation utilisé ici limite la taille des arbres étudiés à moins de deux mètres. Etant donnée la vitesse de croissance élevée du clone de peuplier choisi, cette contrainte impose l'emploi de plants encore au stade juvénile. Parmi les dizaines, voire centaines, d'études publiées portant sur les effets de l'ozone sur les arbres, un grand nombre concerne des plants juvéniles. L'âge des arbres est un facteur important de variabilité de leur sensibilité à l'ozone. Les résultats de la méta-analyse de Wittig *et al*. (2007) indiquent que la concentration ambiante en ozone induit une réduction de 10 % de l'assimilation nette de CO_2 et de 5 % de la conductance stomatique pour les arbres de moins quatre ans, contre respectivement -22 % et -23 % pour les arbres de plus de quatre ans. Si certaines études individuelles confirment cette sensibilité plus prononcée des arbres matures par rapport aux plants juvéniles, d'autres montrent le contraire, en s'appuyant sur la baisse de la conductance stomatique et donc du flux d'ozone potentiel avec l'âge de l'arbre (Saxe 2002). Cet effet a été montré pour le séquoia (Grulke & Miller 1994), l'épicéa (Wieser *et al.* 2000), le tulipier (Rebbeck *et al.* 2004) ou le hêtre (Nunn *et al.* 2005). La variabilité des effets observés rend difficile l'extrapolation des résultats obtenus à partir de plants juvéniles aux arbres matures et *a fortiori* aux écosystèmes forestiers.

III. Problématique scientifique

III.1. Impact de l'ozone et développement foliaire

D'après les résultats de l'étude méta-analytique de Wittig *et al*. (2007), les données publiées depuis trente ans sur impact de l'ozone sur l'assimilation de CO_2 et la conductance stomatique des arbres ne permettent pas de considérer l'âge des feuilles comme un facteur de variabilité de la réponse de ces deux paramètres à l'ozone. Cette absence d'effet vient sans doute ici des catégories prises en compte dans l'analyse qui correspondent à trois classes d'âge : feuilles de moins d'un an, feuilles âgées de un à deux ans et feuilles de plus de deux ans. En effet, un grand nombre d'études individuelles indiquent une plus grande sensibilité à l'ozone des feuilles matures par rapport aux feuilles en expansion, mais cette différence s'observe parmi les feuilles d'une même saison de croissance. Concernant les arbres caducifoliés, le rôle du

développement foliaire dans la sensibilité à l'ozone est documenté de manière conséquente pour le bouleau, pour lequel l'apparition de dommages visibles dus à l'ozone est plus précoce sur les feuilles matures que sur les feuilles à peine formées ou en expansion (Saxe 2002). Pour cette même espèce, Landolt *et al*. (1997) ont aussi montré une augmentation de la fréquence des dommages visibles avec l'âge des feuilles ainsi que des modifications importantes du métabolisme carboné primaire induites par l'exposition à l'ozone, modifications relevées uniquement chez les feuilles les plus âgées. Confirmant ces observations au niveau des processus photosynthétiques, Maurer *et al*. (1997) ont de plus montré que des mécanismes de compensation pouvaient intervenir chez les feuilles jeunes. Dans ces deux études, la sensibilité des feuilles à l'ozone varie en fonction de leur âge mais aussi du niveau de fertilisation, les effets les plus forts étant relevés pour les arbres carencés. En réponse à l'ozone, les feuilles matures de certains clones de bouleau exhibent une accumulation intracellulaire de peroxyde d'hydrogène, accumulation limitée à l'apoplasme dans le mésophylle des feuilles jeunes, ce qui indiquerait une plus forte capacité de détoxication chez ces dernières (Oksanen *et al.* 2005). Le peuplier a aussi fait l'objet d'études de ce type. Le travail très complet de Reich (1983) met en évidence une diminution accélérée des paramètres photosynthétiques (assimilation, chlorophylles, rendement quantique du PSII) en réponse à l'ozone par rapport au processus *normal* de vieillissement des feuilles. Pendant leur période précoce de développement, ces mêmes feuilles affichent une stimulation de la respiration mitochondriale sans que les paramètres photosynthétiques ne soient modifiés par l'ozone. Pour *P. tremula*, l'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique diminuent conjointement avec l'âge des feuilles et en réponse à l'ozone (Coleman *et al.* 1995). Enfin, certaines études montrent une stimulation transitoire de la photosynthèse dans les feuilles jeunes en réponse à l'ozone (Greitner *et al.* 1994), qui indiquerait ici aussi des mécanismes compensatoires.

L'ensemble de ces résultats laisse penser que le stade de développement des feuilles influe sur la sensibilité à l'ozone des arbres caducifoliés. Les seuils critiques d'exposition au polluant pour la végétation sont déterminés en cumulant des moyennes horaires de concentration ou de flux sur une saison de croissance entière (Paoletti & Manning 2007). Si la sensibilité des feuilles varie en fonction de leur phénologie, la période d'occurrence des épisodes d'ozone au cours de la saison de croissance doit être prise en compte, en pondérant par exemple les moyennes horaires en fonction de la phénologie des feuilles. Les indices de flux rendent compte en partie du développement foliaire en intégrant la conductance stomatique, mais d'autres facteurs peuvent expliquer la résistance plus importante des feuilles jeunes.

Dans notre travail, l'impact de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire a été envisagé en relation avec le développement des feuilles. Pour cela, trois étages foliaires ont été considérés constitués (i) de feuilles déjà matures avant même d'être exposées à l'ozone, (ii) de feuilles à peine formées en début de traitement et dont le développement se déroule en présence d'ozone

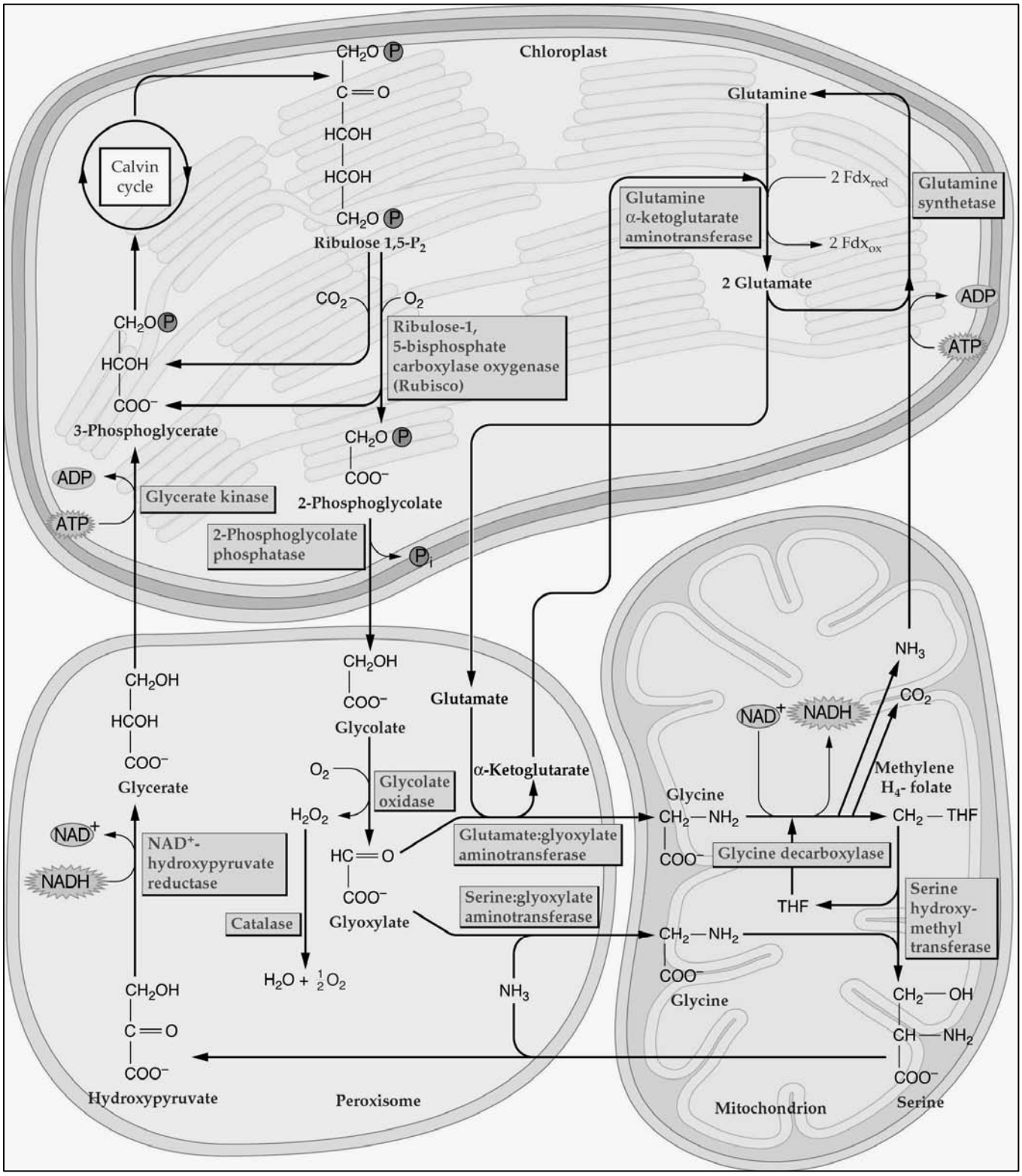


Figure 26 : Cycle de la photorespiration.

Source : Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones Eds.
© 2000, American Society of Plant Physiologists

et (iii) de feuilles néoformées pendant la fumigation. Cette démarche permet d'étudier les effets physiologiques de l'ozone en fonction du développement foliaire, mais aussi ses effets potentiels sur le développement foliaire lui-même. De plus, la détermination de la dose d'ozone cumulée à partir du flux stomatique doit permettre de mettre en évidence des relations dose/effets pour différents étages foliaires.

III.2. Photorespiration

L'impact de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire des arbres forestiers est relativement bien documenté : réduction de la photosynthèse, stimulation de la respiration et des processus cataboliques pour soutenir la mobilisation du système antioxydant et du métabolisme secondaire, activation d'évènements liés à une sénescence précoce. Parmi les voies métaboliques majeures, la photorespiration reste cependant peu étudiée en réponse à l'ozone. Elle joue pourtant un rôle majeur chez les plantes de type C3, chez lesquelles le CO_2 dégagé par photorespiration représente 20 à 25 % du CO_2 assimilé par photosynthèse (Krömer 1995). Le dégagement de CO_2 associé à la photorespiration détourne donc une part importante du carbone disponible pour la croissance de la plante. En tant que principale composante de la respiration à la lumière, un tel processus ne peut être ignoré lors de l'étude de l'impact d'une contrainte environnementale comme l'ozone sur le métabolisme de la plante.

III.2.1. Description du cycle photorespiratoire

Le cycle photorespiratoire met en jeu un ensemble de 10 complexes enzymatiques et d'au moins 6 transporteurs membranaires, répartis dans trois différents organites : le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie. Le cycle débute dans le chloroplaste par l'oxygénation du ribulose-1,5-bisphosphate. Cette réaction met en jeu l'activité oxygénase de la rubisco, qui peut représenter jusqu'à 40 % de son activité carboxylase, et aboutit à la formation d'une molécule de glycérate-3P regagnant le cycle de Calvin et d'une molécule de glycolate-2P, aussitôt déphosphorylée en glycolate par la phosphoglycolate phosphatase. On estime que 75 % des molécules de glycolate-2P formées sont engagées dans le cycle photorespiratoire (Leegood *et al.* 1995). Un transporteur glycolate:glycérate, pouvant fonctionner en mode antiport avec l'ion hydroxyle ou symport avec le proton, permet l'export du glycolate vers le peroxysome (Howitz & McCarty 1991). A l'intérieur du peroxysome, le glycolate est pris en charge par la glycolate oxydase. Cette enzyme, parmi les enzymes peroxysomales les mieux caractérisées, catalyse une réaction irréversible en deux étapes. Dans un premier temps, le glycolate est oxydé en glyoxylate par la FMN, cofacteur lié au site catalytique de l'enzyme et qui, dans un second temps, est ré-oxydé par l'O_2, avec formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 décomposé par la catalase. Le glyoxylate subit ensuite une transamination aboutissant à la formation de glycine.

Deux enzymes peuvent être responsables de cette réaction : la sérine:glyoxylate aminotransférase (SGAT) ou la glutamate:glyoxylate aminotransférase (Wingler *et al.* 1999). Celle-ci nécessite l'import de glutamate depuis le chloroplaste et l'export de 2–oxoglutarate vers le chloroplaste, navette permise par la présence à la surface de l'organelle d'un transporteur couplé au malate pour chacun des deux métabolites (Flugge 1998).

La glycine formée gagne alors, par un mécanisme qui n'a pour l'heure pas été mis à jour, la matrice mitochondriale, où elle est rapidement oxydée par l'action combinée de deux complexes enzymatiques, la glycine décarboxylase (GDC) et la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (Douce *et al.* 2001). Cette étape du cycle photorespiratoire constitue la force motrice de la photorespiration par son équilibre continuellement tourné vers l'oxydation de la glycine (Douce & Neuburger 1999). De plus, les réactions catalysées par le couple GDC/SHMT connectent le cycle photorespiratoire à plusieurs voies métaboliques majeures. En premier lieu, la conversion de la glycine, molécule à deux carbones, en sérine, molécule à trois carbones, amorce le retour vers le cycle de Calvin (Oliver 1994). De plus, le dégagement de CO_2 et la formation de NADH associés à cette réaction sont reliés à la respiration mitochondriale et au cycle des acides tricarboxyliques. L'activité de la SHMT fait par ailleurs intervenir des molécules à un carbone (folate, tétrahydrofolate) et participe au métabolisme C1 à la base de nombreuses voies de biosynthèse. Enfin, la libération d'ammonium associée à l'activité de la GDC relie le cycle photorespiratoire au métabolisme azoté, l'ammonium formé étant pris en charge dans le chloroplaste par le couple GS2/GOGAT.

Le cycle carboné photorespiratoire se poursuit par le transport, par un mécanisme inconnu, de la sérine vers le peroxysome où elle est convertie en hydroxypyruvate par la SGAT mentionnée plus haut, lors d'une réaction couplée à la formation de glycine. L'hydroxypyruvate est ensuite réduit en glycérate par l'hydroxypyruvate réductase (HPR) lors d'une réaction consommant du NADH (Douce & Neuburger 1999). Le transporteur glycolate:glycérate déjà évoqué permet le transport du glycérate vers le chloroplaste où il est phosphorylé par l'action d'une glycérate kinase. Le glycérate-3-phosphate ainsi formé réintègre le cycle de Calvin, ce qui met fin à celui de la photorespiration.

III.2.2. Rôle de la photorespiration

Si on tente d'évaluer le coût métabolique de la photorespiration, on peut noter que la formation de NADH lors de l'oxydation de la glycine compense sa consommation par la réaction catalysée par la HPR. Par contre, au niveau du chloroplaste, le *manque à gagner* que représente l'oxygénation du RuBP par rapport à sa carboxylation, la re-fixation du NH_4^+ par le couple GS2/GOGAT ainsi que la phosphorylation du glycérate nécessitent une consommation non négligeable d'ATP et de pouvoir réducteur (Igamberdiev & Lea 2002). Ainsi, en plus de mobiliser

chez les plantes en C3 une part importante du carbone assimilable, le cycle photorespiratoire implique de forts coûts métaboliques. Mais ce qui pourrait ne faire de la photorespiration qu'un processus futile et coûteux lui confère en fait un rôle physiologique essentiel de dissipation d'énergie. En conditions de forte illumination et de faible concentration en CO_2, lorsque l'ATP et le pouvoir réducteur issus de la photochimie ne peuvent être totalement utilisés (Heber *et al.* 1996), il apparaît un excès d'énergie d'excitation et une surréduction des chaînes photosynthétiques de transfert d'électrons, entraînant le phénomène de photoinhibition. De plus, la fuite d'électrons vers l'oxygène provoque la formation de ROS responsables du phénomène de photooxydation. Dans ces conditions, avec une faible concentration en CO_2 qui favorise l'activité oxygénase de la rubisco, le cycle photorespiratoire permet de consommer l'énergie excédentaire et de protéger la cellule des effets néfastes de la photoinhibition et de la photooxydation (Kozaki & Takeba 1996, Wingler *et al.* 2000), particulièrement en cas de stress hydrique (Noctor *et al.* 2002). Ainsi, des plants d'orge déficients pour la GDC se montrent incapables de transférer le potentiel redox du chloroplaste vers le reste de la cellule, exposant la machinerie photosynthétique à un excès d'électrons et à la formation de ROS (Igamberdiev *et al.* 2001).

III.2.3. Effets de l'ozone sur la photorespiration

L'un des effets physiologiques les plus marqués de l'ozone est la réduction de la capacité photosynthétique via la diminution de l'expression et de l'activité de la rubisco. Capable de catalyser la carboxylation et l'oxygénation du RuBP, la rubisco est à l'origine à la fois de la fixation du CO_2 atmosphérique et du cycle photorespiratoire. *A priori*, on pourrait donc s'attendre à ce que l'exposition à l'ozone cause la réduction coordonnée de la photosynthèse et de la photorespiration. Booker *et al.* (1997) ont mis en évidence une réduction de la photorespiration chez des plants de soja exposés en OTC à une concentration moyenne de 73 ppb 12h par jour pendant quatre mois. En fin d'expérience, le taux de photorespiration et l'activité d'enzymes photorespiratoires (GO, HPR et catalase) étaient réduits de 40 % par le traitement à l'ozone, et cette inhibition était corrélée à celle de la photosynthèse. Une inhibition des activités GO et HPR a également été mise en évidence chez le pin d'alep en réponse à une exposition prolongée à 200 ppb en ozone (Dizengremel 2001). Chez le bouleau, la réduction de la photosynthèse provoquée par l'ozone a été reliée à une augmentation du point de compensation par la lumière due à la stimulation de la respiration sans changement de la photorespiration (Maurer *et al.* 1997). Pour cette même espèce, une prolifération des peroxysomes a été observée en réponse à l'ozone (Oksanen *et al.* 2005). Les auteurs expliquent cette prolifération par une possible stimulation de la photorespiration ou par l'apport d'une capacité supplémentaire de détoxication grâce au système antioxydant peroxysomal. On le voit, les études portant sur l'effet de l'ozone

sur la photorespiration sont peu nombreuses et leurs résultats parfois contradictoires. Notre travail constitue, à notre connaissance, la première étude des effets de l'ozone sur la photorespiration en elle-même pour une espèce ligneuse. La réponse du cycle photorespiratoire a été évaluée par un certain nombre de paramètres. Tout d'abord, la capacité photorespiratoire *in vivo* a été déterminée en combinant des mesures d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne. De plus, l'activité de plusieurs enzymes associées au cycle photorespiratoire a été mesurée, à commencer par l'activité carboxylase de la rubisco, qui, bien que ne rendant pas compte directement de l'oxygénation du RuBP à l'origine de la photorespiration, est un bon indicateur de la capacité totale de la rubisco. La mesure de l'activité de deux enzymes peroxysomales participant au cycle photorespiratoire, la glycolate oxydase (GO) et l'hydroxypyruvate réductase (HPR), permet d'évaluer la capacité photorespiratoire en amont (GO) et en aval (HPR) de l'étape clé mitochondriale. Cette étape, catalysée par le couple GDC/SHMT, a été étudiée par le biais de la mesure par immunoblot de la quantité de ces deux enzymes. Enfin, un dernier aspect de la photorespiration a été étudié en déterminant l'activité de la glutamine synthétase (GS), responsable du recyclage de l'ammonium produit par la photorespiration. La mesure des paramètres photorespiratoires combinée à celle de la photosynthèse et de la respiration mitochondriale permet d'évaluer la réponse du métabolisme carboné primaire à l'ozone au cours du développement foliaire.

Le travail présenté dans ce mémoire comporte deux objectifs principaux :

- *améliorer la compréhension des effets de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire en relation au développement foliaire*
- *caractériser le comportement de la photorespiration en réponse à l'ozone.*

Une variété de techniques a été mise en œuvre pour identifier des réponses moléculaires et cellulaires à l'exposition à l'ozone et les relier à des effets mesurés à l'échelle de la feuille voire de la plante entière. En complément, notre étude est étayée par des analyses transcriptomique et protéomique présentées en annexes.

MATÉRIEL & MÉTHODES

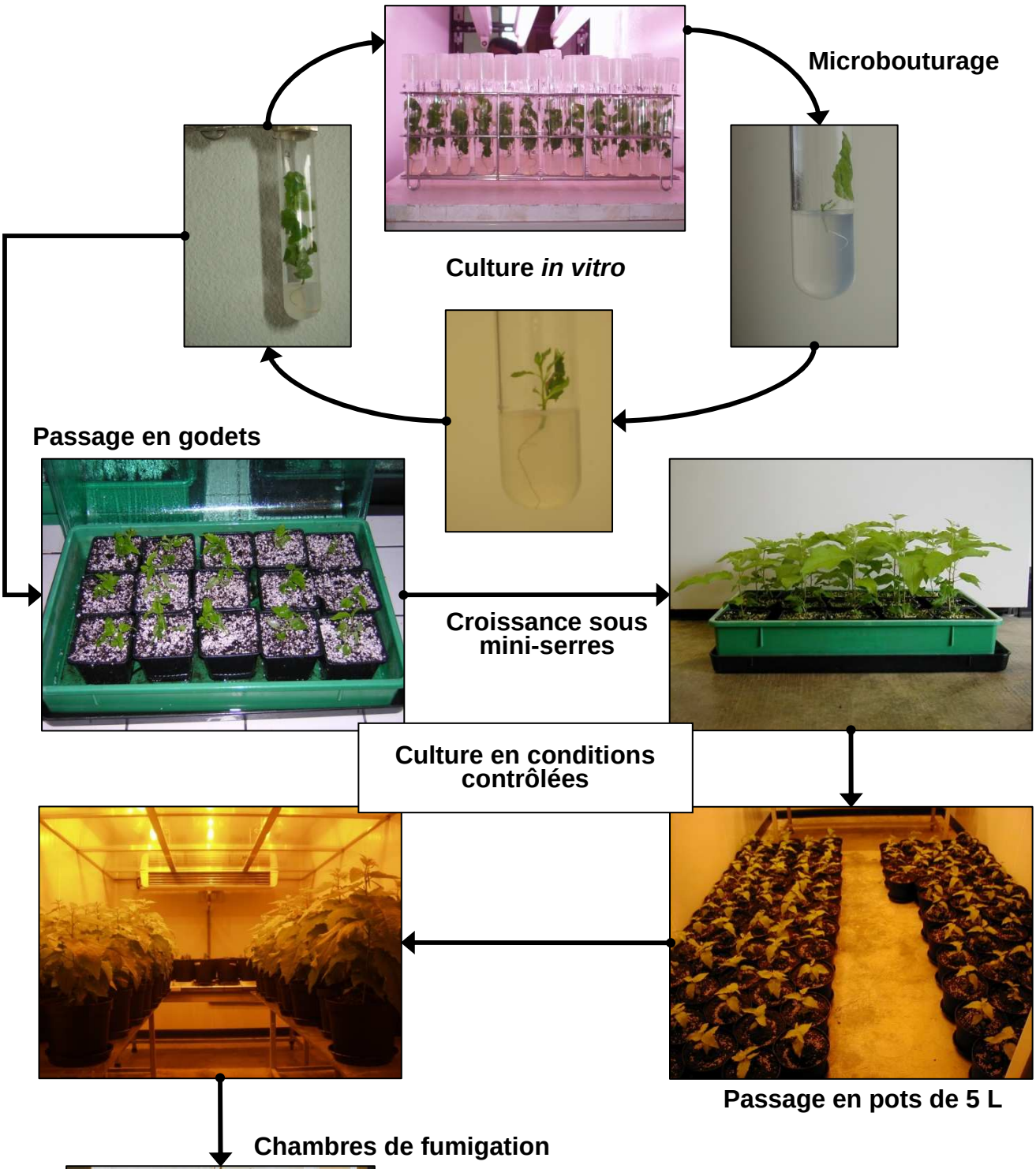


Figure 27 : Étapes de culture des peupliers, depuis la propagation *in vitro* jusqu'au début de la fumigation.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Matériel végétal et conditions de culture

L'étude a été menée sur de jeunes plants de peuplier grisard (*Populus* x *canescens* (Aiton) Sm.), hybride interspécifique issu du croisement entre le peuplier tremble (*Populus tremula* Michx.) et le peuplier blanc (*Populus alba* L.). Le clone étudié (clone INRA 717-1 B4) a été obtenu à l'INRA d'Orléans et est actuellement en test en vue d'une admission sous le nom de cultivar *Rajane*.

Les arbres étudiés sont issus de microboutures en culture *in vitro* provenant du centre INRA d'Orléans. Les vitroplants ont été conservées dans les chambres climatisées de l'UMR 1137 de Nancy, sous rampes lumineuses, avec une héméropériode de 16 h, un degré d'hygrométrie de 80 % et une température de 25°C. Les vitroplants de peupliers ont été régulièrement repiqués en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (ADS Laminaire, Le Pré-Saint-Gervais, France). Le milieu de culture utilisé est un milieu de Murashige et Skoog dilué une fois (Murashige & Skoog 1962). Dans les semaines qui suivent le repiquage, un système racinaire se forme à la base des entre-nœuds bouturés puis une nouvelle tige feuillée se développe à partir de l'unique bourgeon axillaire conservé sur la microbouture.

Après deux à trois mois de croissance, les vitroplants sont transférés dans des pots de plastique de 0,4 L remplis d'un mélange en proportions égales de perlite et de terreau (Gramoflor SP1 Universel, N/P/K 14/16/18, 1,2 $kg.m^{-3}$) additionné de cinq granulés nutritifs (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2). Les pots sont placés en chambre de culture en conditions contrôlées, avec une héméropériode de 14 h, un PPFD de 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (lampes à vapeur de sodium, Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas), un degré d'hygrométrie de 75 % ± 5 % et une température de 22°C ± 2°C. Au cours de la nyctipéri ode, le degré d'hygrométrie passe à 85% ±5% et la température à 18°C ± 2°C. Lors de la première semaine, les plants sont maintenus sous serre pour conserver un fort taux d'hygrométrie et sont fréquemment brumisés. Les cloches des miniserres sont ensuite progressivement relevées, puis retirées. Après trois semaines, les plants sont transférés dans des pots de 5 L contenant du terreau (Gramoflor SP1 Universel, N/P/K 14/16/18, 1,2 $kg.m^{-3}$) additionné de 15 g de granulés nutritifs (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2). Une couche de billes d'argile expansée est disposée au fond des pots pour améliorer le drainage.

C.

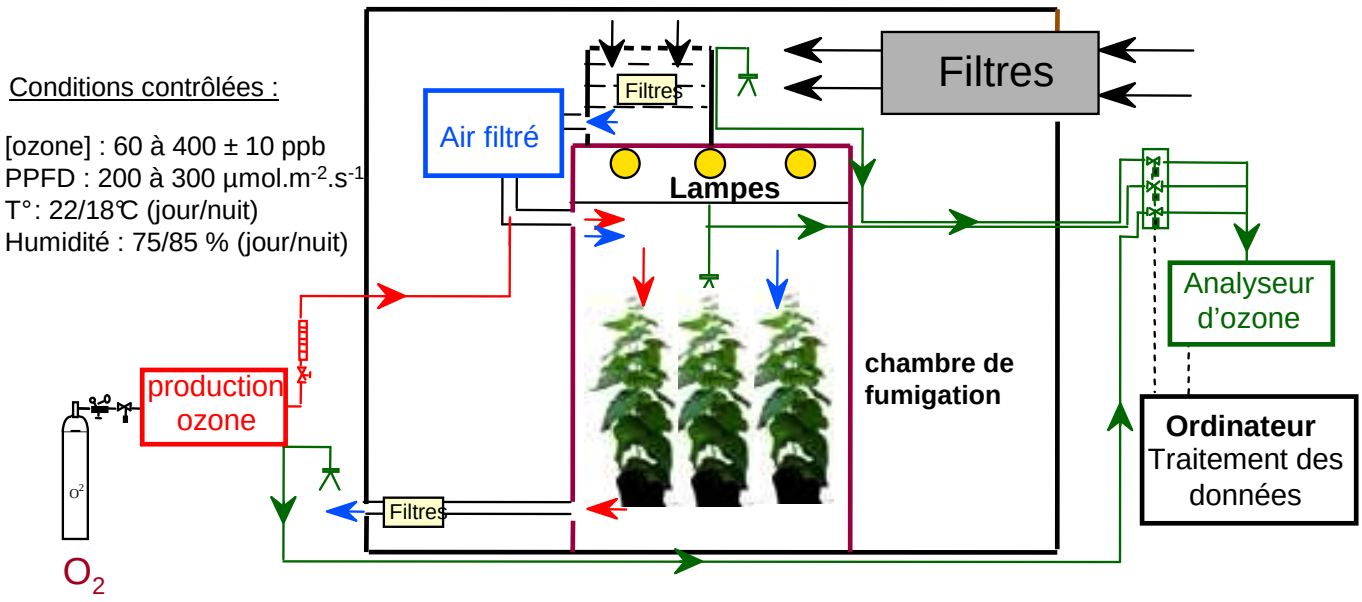


Figure 28 : **A**. Vue extérieure des chambres de fumigation, **B**. vue intérieure d'une chambre, **C**. schéma du dispositif expérimental de fumigation à l'ozone.

Lorsque les arbres atteignent une hauteur d'au moins 60 cm, une centaine d'individus est sélectionnée de façon à former un échantillon homogène. Ces arbres sont transférés et répartis dans les huit chambres de fumigation, à raison de douze arbres par chambre. Les arbres sont maintenus en chambre de fumigation dans des conditions environnementales identiques à celles régnant dans les chambres de culture. A l'issue de cette période d'acclimatation, la moitié des arbres, soit 48 arbres répartis dans quatre chambres de fumigation, est traitée à l'ozone pendant 35 jours. Les 48 arbres restants, répartis dans les quatre autres chambres de fumigation, conservent les mêmes conditions de culture avec une atmosphère filtrée dépourvue d'ozone et forment le lot *témoin*. Le dispositif de fumigation ainsi que la procédure suivie seront décrits plus précisément dans le paragraphe suivant.

En chambre de culture comme en chambre de fumigation, les arbres sont régulièrement arrosés avec de l'eau courante à température ambiante. De plus, les arbres sont espacés de façon à réduire l'ombrage et régulièrement déplacés au sein des chambres. Les ramifications secondaires sont coupées afin de maintenir la croissance de la tige principale.

II. Fumigation à l'ozone

II.1. Description du dispositif

L'ozone est produit à partir d'oxygène pur par deux générateurs (OZ500 Fischer, Bonn, Allemagne, et CMG3-3 Innovatec II, Rheinbach, Allemagne). Au sein de ces deux générateurs, les molécules de dioxygène (O_2) sont dissociées par un arc électrique et se réassocient de façon aléatoire, formant des molécules d'ozone (O_3). L'ozone ainsi produit est injecté dans le circuit de ventilation des chambres de fumigation. La régulation de ce flux est assurée par des débitmètres, et la concentration en ozone dans l'ensemble du dispositif est mesurée en continu à l'aide d'un analyseur UV (O341M, Environment S.A., Paris, France) associé à une station d'acquisition informatique.

Les chambres de fumigation sont des enceintes climatisées de 1,2 m de côté pour une hauteur de 2 m. L'éclairement, assuré par cinq lampes à vapeur de sodium (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas), permet d'atteindre un PPFD de 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ au niveau des plants. L'intensité lumineuse a été mesurée dans deux chambres en fonction de la distance au plafond à l'aide du capteur intégré au système portatif de mesure d'échanges gazeux LI-6200 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Température et degré d'hygrométrie sont mesurés deux fois par heure dans chaque chambre en même temps que la concentration en ozone. Des filtres à charbon actif

permettent d'éliminer l'ozone de l'air extérieur envoyé aux chambres de fumigation. La concentration en ozone est ainsi limitée à une valeur maximale de 10 ppb dans les chambres témoins. L'air enrichi en ozone est lui filtré à la sortie des chambres avant rejet dans l'atmosphère.

II.2. Procédure de fumigation

La période journalière de fumigation débute une heure après le début de l'héméropériode et couvre les 13 h restantes jusqu'à l'extinction des lampes. Les arbres traités sont exposés à une concentration en ozone de 120 ppb ± 10 ppb. Une heure environ est nécessaire avant d'atteindre la concentration souhaitée. En fin de journée, la concentration en ozone met quelques minutes pour retomber à zéro. La période de fumigation dure 35 jours sans interruption.

II.3. Indices d'exposition à l'ozone

L'enregistrement de la concentration en ozone dans le dispositif de fumigation permet d'obtenir deux valeurs par heure pour chaque chambre de fumigation. La moyenne horaire de concentration en ozone ($[O_3]_h$, en ppb) est la moyenne de ces deux valeurs, calculée pour chaque chambre. L'indice SUM00 correspond à la somme des moyennes horaires de concentration en ozone en ppb.

$$\text{SUM00} = \sum_{i=1}^{n} [O_3]_{h_i} \qquad (5)$$

L'indice AOT40 (*accumulated dose over a threshold of 40 ppb*) est défini comme la somme des différences entre les moyennes horaires de concentration en ozone (en ppb) et un seuil de 40 ppb, en mettant à zéro les termes négatifs et pour un éclairement énergétique minimum de 50 $W.m^{-2}$ (Karenlämpi & Skarby 1996). Ce seuil de 50 $W.m^{-2}$ correspond à un PPFD d'environ 220 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ proche de l'éclairement fourni dans les chambres de fumigation. L'indice AOT40 peut donc être calculé par la formule suivante :

$$\text{AOT40} = \sum_{i=1}^{n} \max([O_3]_{h_i} - 40) \qquad (6)$$

La dose cumulée d'ozone (CUO, *cumulative ozone uptake*) entrant dans le mésophylle est déterminée à partir des concentrations horaires en ozone et des mesures de conductance stomatique (g_s). La diffusion de l'ozone à travers la cuticule, 10 000 fois plus faible que le flux stomatique, est considérée comme négligeable (Kerstiens & Lendzian 1989). En outre, la

résistance à la diffusion de l'ozone dans le mésophylle causée par la couche limite n'est pas prise en compte étant donné le flux d'air continu et relativement élevé dans les chambres de fumigation (Crous *et al.* 2006). Le flux instantané d'ozone (F_{O_3}) entrant dans le mésophylle correspond donc au produit de la conductance stomatique pour l'ozone (g_{O_3}, en $mmol.m^{-2}.s^{-1}$) par la différence entre la concentration ambiante en ozone et celle du mésophylle (en $nmol.mol^{-1}$).

$$F_{O_3} = g_{O_3} ([O_3]_{amb} - [O_3]_{int}) \quad (7)$$

La conductance stomatique pour l'ozone est reliée à la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) par un facteur correctif prenant en compte la différence de diffusivité entre l'ozone et la vapeur d'eau (Laisk *et al.* 1989, Emberson *et al.* 2000b) :

$$g_{O_3} = \frac{g_s}{1{,}68} \quad (8)$$

Bien que des valeurs non négligeables de concentration en ozone aient été mesurées dans le mésophylle de feuilles de haricot (*Phaseolus vulgaris*) exposées au polluant (Moldau & Bichele 2002), on considère généralement que l'ozone se décompose très rapidement dans l'apoplasme (Laisk *et al.* 1989) et que sa concentration dans le mésophylle est nulle (Grulke *et al.* 2007). Le flux instantané d'ozone, exprimé en nanomoles d'ozone par seconde et par unité de surface foliaire ($nmol.m^{-2}.s^{-1}$), peut donc être calculé par la formule :

$$F_{O_3} = \frac{[O_3]_{amb}\ g_s}{1{,}68} \quad (9)$$

La dose horaire d'ozone est déterminée en intégrant sur une heure le flux instantané d'ozone entrant dans le mésophylle, en utilisant les moyennes horaires de concentration en ozone $[O_3]_h$ et les mesures de conductance stomatique (g_s) réalisées tous les deux à trois jours selon la méthode décrite dans le paragraphe III.5 de la présente section. Comme les conditions environnementales régnant dans la chambre de fumigation sont stables au cours de la journée, la valeur de g_s mesurée un jour donné est assignée à toutes les heures de ce jour. Les valeurs moyennes horaires de g_s pour les jours sans mesure sont obtenues par interpolation linéaire entre les valeurs des jours précédent et suivant. La dose cumulée d'ozone (CUO, en $mmol.m^{-2}$) correspond à la somme des doses horaires sur l'ensemble de la période d'étude :

$$CUO = \sum_{i=1}^{n} \frac{3600.[O_3]_{h_i} . g_{s_i}}{1{,}68} \quad (10)$$

Tableau 1 :
Récapitulatif des mesures réalisées au cours des trois expériences de fumigation.

Mesures	**2004**	**2006**	**2007**
Croissance en hauteur et radiale	**x**	**x**	
Nombre de feuilles (totales, tombées, formées)	**x**	**x**	
Production de biomasse		**x**	
Surface foliaire	**x**	**x**	
SLA		**x**	
Détection du peroxyde d'hydrogène et de l'ion superoxyde		**x**	
Teneur en chlorophylles totales	**x**		
Échanges gazeux (assimilation et conductance stomatique)	**x**		
Conductance stomatique	**x**		
Courbes A/C_i	**x**		
Fluorescence chlorophyllienne		**x**	
Activités enzymatiques	**x**	**x**	**x**
Gels d'activité glutamine synthétase			**x**
Immunoblot pour la GDC H et SHMT	**x**	**x**	
Analyse protéomique		**x**	**x**

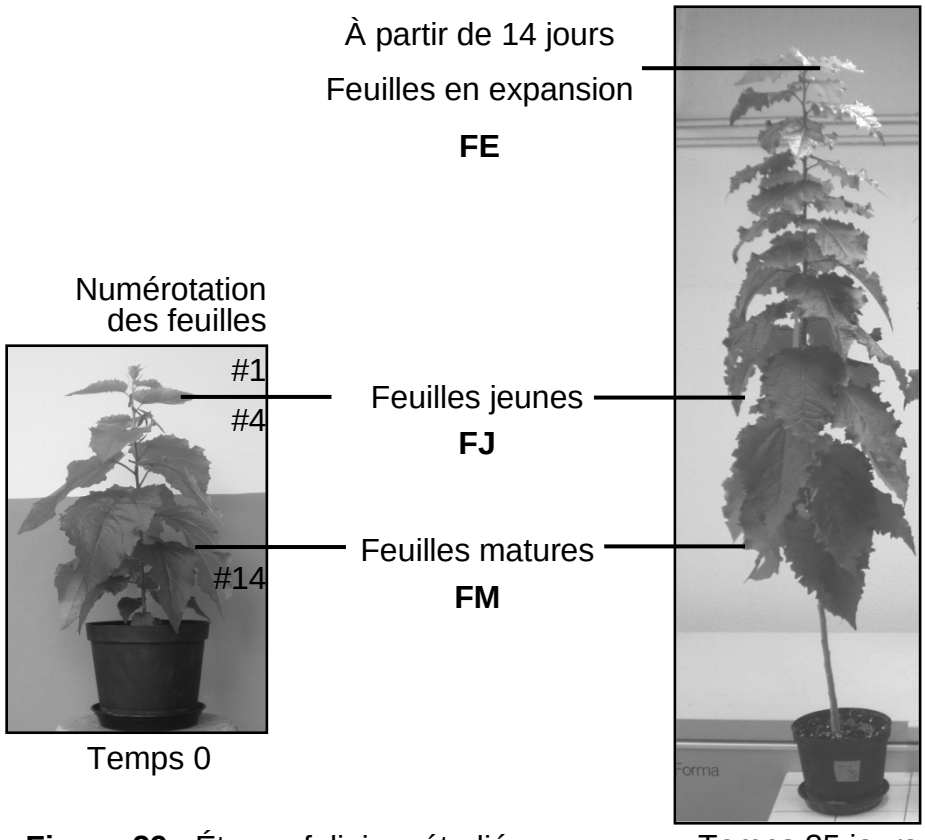


Figure 29 : Étages foliaires étudiés.

III. Méthodes

III.1. Expériences répétées

Trois expériences de fumigation ont été réalisées au cours de cette étude, en 2004, 2006 et 2007. Les étapes de la culture des arbres, du stade *in vitro* jusqu'à la fumigation, sont identiques d'une expérience à l'autre. De la même façon, les conditions de fumigation et la durée de traitement ont été conservées, ainsi que les procédures d'échantillonnage et de prélèvement. Les différentes mesures réalisées lors des trois expériences de fumigation sont présentées dans le tableau 1.

III.2. Développement foliaire et procédure de prélèvement

III.2.1. Étages foliaires

Au début de la période de fumigation, les feuilles de chaque arbre sont numérotées à partir de la première feuille formée au niveau du bourgeon terminal dont le limbe est entièrement déroulé (feuille #1), et les feuilles #4 et #14 sont étiquetées. La feuille #4 est en expansion et mesure de 5 à 7 cm de long, tandis que la feuille #14 est déjà complètement développée. Deux étages foliaires sont ainsi définis : les *feuilles jeunes* (FJ, feuille #4) et les *feuilles matures* (FM, feuille #14). FJ et FM sont suivies tout au long de l'expérience. À partir de 14 jours de traitement, un nouvel étage foliaire est pris en compte, celui des *feuilles en expansion* (FE). Ces feuilles présentent un stade de développement équivalent à celui des feuilles #4 en début d'expérience. Contrairement aux FJ et FM suivies tout au long de l'expérience, de nouvelles FE sont désignées à chaque prélèvement et temps de mesure, avec à chaque fois le même stade de développement que les FJ au temps 0.

III.2.2. Prélèvements des feuilles

Une feuille par arbre et par étage foliaire est prélevée à 0, 3, 7, 14, 21, 28 et 35 jours de traitement pour les FJ et les FM, et à 14, 21, 28 et 35 jours de traitement pour les FE. Pour les FJ à 0, 3 et 7 jours de traitement et pour les FE, deux feuilles par arbres son récoltées de manière à disposer d'une quantité de matériel foliaire suffisante. Pour éviter une défeuillaison trop prononcée, seulement deux arbres par chambre sont prélevés à chaque temps, en alternant parmi les dix arbres concernés dans chaque chambre. Après cinq prélèvements, soit à partir de 28 jours de traitement, des échantillons ont du être collectés sur des arbres déjà prélevés. Dans

ce cas, la première feuille au-dessus des feuilles récoltées est choisie. Les prélèvements ont lieu en milieu d'héméropériode. Les échantillons sont immédiatement plongés dans l'azote liquide et sont stockés à -80°C avant analyse.

III.2.3. Détermination de la surface foliaire

Pour permettre une mesure rapide de la surface foliaire, une relation a été établie entre la surface des feuilles et leurs dimensions (largeur et longueur). En fin de fumigation, la longueur, la largeur et la surface de l'ensemble des feuilles de quatre arbres traités et quatre arbres témoins ont été mesurées à l'aide d'un triple décimètre et d'un planimètre (caméra vidéo couplée à un analyseur d'image DeltaT, U.K.). Au total, 97 feuilles ont ainsi été analysées. La relation établie est présentée dans la partie *Résultats*.

III.3. Mesures de croissance et de biomasse

Le nombre total de feuilles, la hauteur de tige du collet au bourgeon terminal et le diamètre de la tige à 1,5 cm du sol ont été mesurés sur l'ensemble des arbres à 0, 14, 25 et 35 jours de traitement. Pour réduire les erreurs dues à la forme plus ou moins ovale de la section des tiges, une valeur moyenne du diamètre à 1,5 cm est calculée à partir de deux mesures réalisées selon deux axes orthogonaux. Le nombre de feuilles tombées est compté quotidiennement.

Quatre (à 0 et 14 jours de traitement) et huit (à 35 jours) arbres par traitement ont été retirés des chambres de fumigation pour des mesures de biomasse. Feuilles, tiges et racines ont été séparées et leur masse fraîche pesée. Les feuilles ont été divisées en trois groupes séparés par les feuilles étiquetées (feuilles #4 et #14) : au-dessus de la feuille #4, les feuilles en *expansion* ; entre les feuilles #4 et #14, les feuilles *jeunes* ; en dessous de la feuille #14, les feuilles *matures*. La matière sèche a été pesée après conservation du matériel végétal pendant un mois à 70°C.

Le taux de croissance relative sur la période d'étude (*relative growth rate*, RGR, en $g.g^{-1}.j^{-1}$) est calculé selon l'équation de Fischer :

$$RGR = \frac{\ln MS_{35} - \ln MS_0}{t_{35} - t_0} \qquad (11)$$

où MS_0 et MS_{35} correspondent à la masse de matière végétale sèche au début (t_0) et à la fin (t_{35}) de l'expérience.

L'humidité pondérale (HP, en $g_{H_2O}.g^{-1}_{MS}$) est donnée par la relation suivante :

$$HP = \frac{MF - MS}{MS} \quad (12)$$

où MF et MS correspondent respectivement à la masse de matière fraîche et sèche (en g) déterminée à un temps donné.

La surface foliaire spécifique (*specific leaf area*, SLA, en $cm^2.g_{MS}$) est determinée en rapportant la surface foliaire à la masse de matière sèche de la feuille.

III.4. Étude histologique

III.4.1. Microscopie optique

Des disques foliaires de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à 0, 7, 14, 21, 28 et 35 jours de traitement. A chaque temps, les prélèvements concernent une feuille par étage foliaire (FJ, FM, et FE à partir de 14 jours) sur trois arbres par traitement. Une feuille déjà prélevée est exempte des récoltes ultérieures. Lorsqu'une feuille présente des symptômes visibles de dommages, un premier disque est découpé au niveau d'une zone nécrotique et un deuxième dans une zone non touchée. Après récolte, les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4°C dans la solution suivante :

Tampon phosphate pH 7,2 (0,1 M), Paraformaldéhyde (2 % v/v), Glutaraldéhyde (0,5 % v/v).

Des bandes de quelques mm de large sont découpées dans les disques foliaires et incluses à la verticale dans de l'agar à 6 % (m/v). Les blocs d'agar sont ensuite taillés et fixés sur la platine d'un appareil de type Vibratome (Leica VT1000S). Des coupes transversales de 15 µm d'épaisseur sont réalisées à partir des bandes foliaires incluses. Ces coupes sont aussitôt montées entre lame et lamelle dans de l'eau glycérinée et observées à l'aide d'un microscope photonique (Nikon Optiphot-2) à un grossissement de 40 fois. Les prises de vue sont réalisées au moyen d'un appareil numérique adapté au microscope (Nikon D1).

III.4.2. Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène

Des disques foliaires de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à 23, 28 et 35 jours de traitement. Les disques sont découpés sur la feuille #9 d'arbres traités et d'arbres témoins. Pour les feuilles nécrosées, les disques foliaires ont été prélevés de façon à inclure, intégralement ou non selon leur taille, les zones nécrosées. Des disques sont aussi prélevés dans des zones dépourvues de nécroses ainsi qu'en bord de feuille. Ce dernier type de prélèvement permet d'observer une zone exempte du stress mécanique induit par la découpe à

l'emporte-pièce. Sur les feuilles des arbres témoins, des prélèvements identiques sont effectués, en ciblant les mêmes parties de la feuille que celles prélevées sur les feuilles traitées.

Le protocole de détection *in situ* du peroxyde d'hydrogène (H_20_2) est adapté de celui décrit par Thordal-Christensen *et al.* (1997). Les disques foliaires sont déposés sur une microplaque de 24 puits contenant chacun 1,5 mL d'une solution de DAB (*3,3'-diaminobenzine tétrahydrochloride*) à 1 $g.L^{-1}$. Ce composé s'oxyde en présence du peroxyde d'hydrogène endogène et forme un précipité brun-rouge. Pour chaque feuille échantillonnée, quatre puits sont consacrés à la coloration au DAB et deux puits supplémentaires sont additionnés d'acide ascorbique à une concentration finale de 10 mM (Dutilleul *et al.* 2003). La présence d'ascorbate en excès permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène et de contrôler l'effet du DAB lui-même. Les tissus foliaires sont infiltrés avec la solution de DAB pendant trois séquences de 5 minutes sous une cloche à vide. La microplaque est ensuite conservée 14 heures à l'obscurité à température ambiante. L'infiltration et la coloration au DAB sont réalisées sur la même microplaque pour les disques prélevés sur les plants témoins et sur ceux traités à l'ozone. Après la période d'incubation à l'obscurité, les disques sont placés dans des bains successifs d'éthanol à 96% à température ambiante jusqu'à leur décoloration complète :

- 1er bain : 6 h à l'obscurité dans 6 mL d'éthanol, les tubes sont agités au bout de 3 h pour homogénéiser la solution de décoloration.
- 2ème bain : 4 h à l'obscurité dans 6 mL d'éthanol, les tubes sont agités au bout de 2 h pour homogénéiser la solution de décoloration.
- 3ème bain : toute la nuit dans 6 mL d'éthanol.

Après décoloration, les échantillons foliaires sont montés entre lame et lamelle dans une solution de glycérol à 50 % et observés au moyen d'une loupe binoculaire (Nikon SMZ 1000). Des prises de vue sont réalisées à l'aide d'un appareil numérique (Nikon D1). La présence de peroxyde d'hydrogène est mise en évidence par l'apparition d'une coloration brun-rouge.

III.5. Quantification de la teneur en chlorophylles totales

La teneur foliaire en chlorophylles totales (Chl) est mesurée tous les deux à trois jours au moyen d'un chlorophylle-mètre CCM-200 (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Cet appareil effectue deux mesures d'absorption énergétique dans les bandes de longueur d'onde correspondant au rouge et à l'infra-rouge. L'absorbance des pigments chlorophylliens est forte dans le rouge et presque nulle dans l'infra-rouge. Après une calibration de référence à 100 % de transmission, la mesure dans le rouge détermine ainsi la teneur foliaire en chlorophylles, alors que la mesure dans l'infra-rouge donne des indications sur la structure de la feuille (absorptivité

et épaisseur des tissus foliaires). L'appareil mesure un indice appelé CCI (*chlorophyll content index*) correspondant à la teneur foliaire en pigments chlorophylliens. Deux mesures par feuille sont réalisées, à l'écart des tâches nécrotiques dues à l'ozone pour maintenir la relation entre CCI et teneur en chlorophylles (Neufeld *et al.* 2006).

Dreyer *et al*. (communication personnelle) ont établi une relation entre les valeurs de CCI et la concentration en chlorophylle déterminée par la méthode biochimique destructive décrite par Wellburn (1994) :

$$[Chl] = 0{,}0214(CCI) \qquad r^2 = 0{,}9754 \qquad (13)$$

Cette relation, calculée à partir de 58 échantillons foliaires provenant de 4 espèces d'arbres (*Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *Carpinus betulus*, *Populus euphratica*), permet d'exprimer les valeurs de CCI en teneur en chlorophylles totales en $g.m^{-2}$.

III.6. Mesure des échanges gazeux foliaires

III.6.1. Principe

La conductance stomatique (g_s) et l'assimilation nette (A) sont mesurées à l'aide d'un système portatif de mesure d'échanges gazeux LI-6200 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Ce système permet, par le biais d'analyseurs de gaz à infra-rouge (IRGA), de mesurer l'évolution de la concentration en CO_2 et en vapeur d'eau d'une surface de feuille enfermée dans une chambre de mesure transparente et étanche d'une capacité de 4 L. L'évolution de la concentration en vapeur d'eau permet de calculer le taux de transpiration et la résistance totale de la feuille à la diffusion de la vapeur d'eau, qui permet de déterminer la conductance stomatique. L'évolution de la concentration en CO_2 permet quant à elle de déterminer le taux d'assimilation nette de CO_2 pour la surface foliaire étudiée.

III.6.2. Mesures

Les mesures ont eu lieu dans les chambres de fumigation, tous les deux à trois jours et deux heures au moins après le début de l'héméropériode. Les échanges gazeux foliaires sont mesurés sur deux arbres par chambre. Les arbres concernés ne subissent pas de prélèvements destructifs. Sur chaque arbre (huit traités et huit témoins), une feuille par étage foliaire est analysée à chaque temps de mesure. Les résultats sont exprimés par unité de surface foliaire incluse dans la chambre de mesure de l'appareil.

III.7. Courbes de réponse de la photosynthèse au CO_2

III.7.1. Principe et interprétation des courbes *A*/*C*$_i$

Réaliser une courbe de réponse de la photosynthèse à la concentration intracellulaire en CO_2 (courbes *A*/*C*$_i$) revient à mesurer l'assimilation nette de CO_2 d'une surface foliaire à différentes concentrations en CO_2. L'interprétation des courbes *A*/*C*$_i$ repose sur le modèle de photosynthèse foliaire de Farquhar, modèle fonctionnel basé sur les propriétés cinétiques de la rubisco décrites selon le formalisme de Michaelis-Menten (Farquhar *et al.* 1980, Von Caemmerer & Farquhar 1981). Ce modèle s'appuie sur l'hypothèse que l'assimilation nette de CO_2 est le résultat de trois processus :

- la carboxylation du RuBP par la rubisco, consommatrice de CO_2 à la vitesse V_c.
- l'oxygénation du RuBP par la rubisco (V_o), qui initie la photorespiration et mène à la formation d'une mole de CO_2 pour deux moles d'O_2 fixées.
- la respiration associée aux phosporylations oxydatives mitochondriales et productrice de CO_2 (*day respiration*, R_d).

D'après cette hypothèse, l'assimilation nette de CO_2 peut s'écrire :

$$A = V_c - \frac{1}{2} V_o - R_d = V_c \left(1 - \frac{1}{2}\frac{V_o}{V_c}\right) - R_d \qquad (14)$$

Les réactions de carboxylation et d'oxygénation du RuBP par la rubisco mettent en jeu le même site actif. Il en résulte un phénomène d'inhibition compétitive décrit par la relation suivante :

$$\frac{V_o}{V_c} = \frac{1}{\tau} \times \frac{O}{C_i} \qquad (15)$$

où O est la pression partielle d'O_2 dans le mésophylle (21 kPa) et C_i celle du CO_2. Le facteur τ est la constante de spécificité de la rubisco pour le CO_2 par rapport à l'O_2, telle que :

$$\tau = \frac{V_{cmax}}{V_{omax}} \times \frac{K_o}{K_c} \qquad (16)$$

V_{cmax} et Kc correspondent respectivement à la vitesse maximale et la constante de Michaelis de carboxylation du RuBP par la rubisco, et V_{omax} et K_o à celles de son oxygénation. La constante de spécificité de la rubisco, qui repose sur les propriétés biochimiques d'une enzyme relativement conservée dans le règne végétal, varie très peu entre espèces de plantes supérieures de type C_3. Le rapport V_o/V_c peut aussi être exprimé en fonction du point de compensation photosynthétique (Γ^*). Ce paramètre décrit la concentration en CO_2 pour laquelle

le dégagement de CO_2 associé à la photorespiration compense l'assimilation de CO_2 par la photosynthèse, avec $V_c = 2V_o$. Le point de compensation photosynthétique est donné par :

$$\Gamma^* = \frac{1}{2}.\frac{O}{\tau} \quad (17)$$

En combinant les équations (14), (15) et (17), l'assimilation nette peut s'écrire :

$$A = V_c\,(1-\frac{\Gamma^*}{C_i}) - R_d \quad (18)$$

Les sites actifs de la rubisco peuvent être soit saturés, soit limités en RuBP. Dans le premier cas, l'activité de l'enzyme est contrôlée par ses caractéristiques cinétiques et par les concentrations en CO_2 et en O_2. Dans le cas d'une restriction par la disponibilté en RuBP, autrement dit par la vitesse de régénération du RuBP, l'activité de la rubisco peut être limitée par la disponibilité en pouvoir réducteur et en ATP, et donc par le flux d'électrons photosynthétiques, ou par la régénération du P_i liée à l'utilisation des trioses-phosphate.

Pour une valeur de C_i donnée, la vitesse de carboxylation (V_c) de la rubisco est donnée par la plus faible des trois vitesses de carboxylation potentielles limitées par la rubisco (W_c), la régénération du RuBP (W_j) ou l'utilisation des trioses-phosphate (W_P) :

$$A = \min\{W_c, W_j, W_P\}(1-\frac{\Gamma^*}{C_i}) - R_d \quad (19)$$

avec :

$$W_c = \frac{V_{c\,max} \times C_i}{C_i + K_c\,(1+\frac{O}{K_o})} \quad (20)$$

$$W_j = \frac{J_{max} C_i}{4C_i + 8\Gamma^*} \quad (21)$$

$$W_P = \frac{3TPU}{(1-\frac{\Gamma^*}{C_i})} \quad (22)$$

La phase de limitation de l'assimilation par la rubisco est généralement observée pour des C_i inférieures à 200 ppm. La limitation par la régénération du RuBP s'établit à des C_i supérieures à 300 ppm. La situation de limitation par l'utilisation des trioses-phosphate ne se produit qu'en cas de rétro-inhibition par l'exportation de glucides ou de très forte carence en phosphore et est rarement observée *in vivo*.

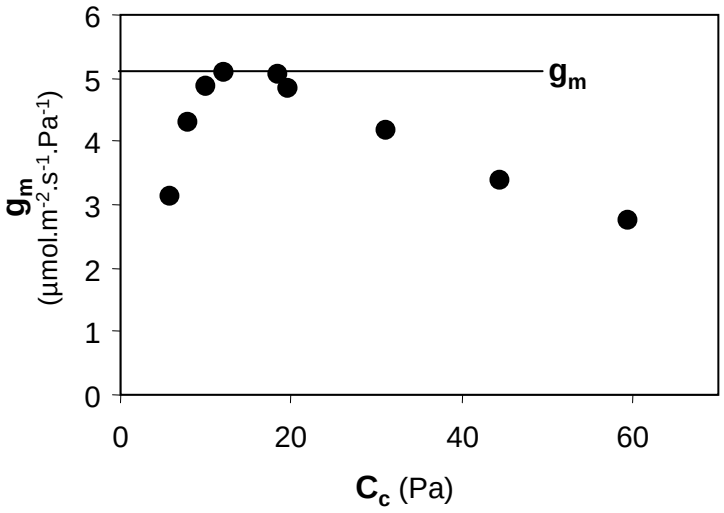


Figure 30 : Détermination de la conductance du mésophylle (g_m) appliquée à l'ajustement des courbes A/C_i à partir du plateau des courbes g_m/C_c.

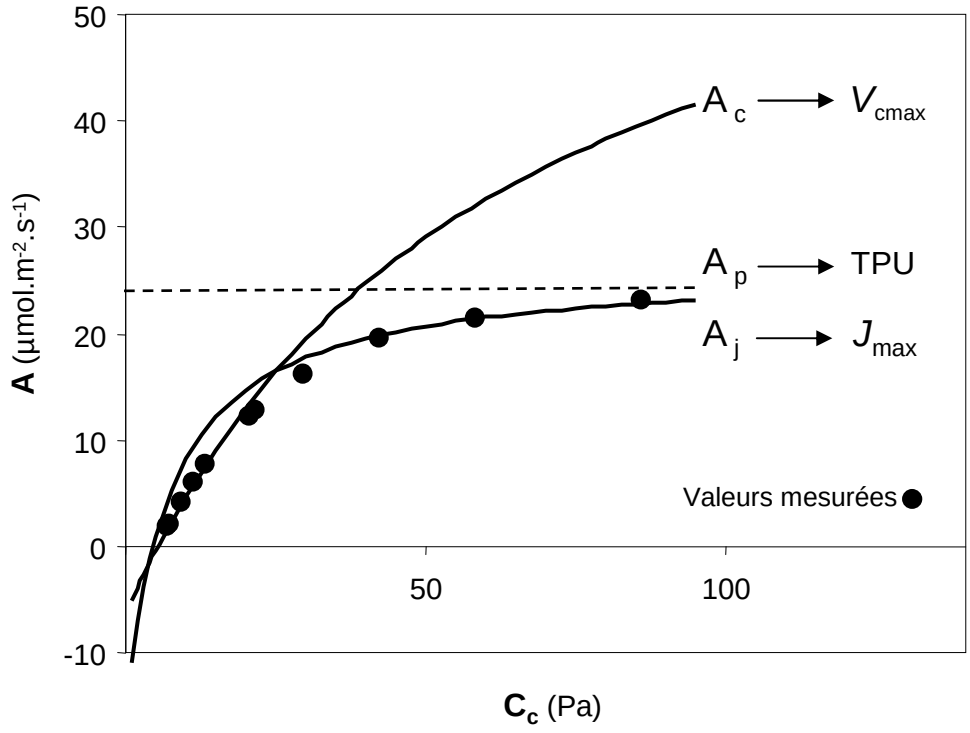


Figure 31 : Ajustement des courbes A/C_c.
L'assimilation nette de CO_2 (A) peut être décrite par trois fonctions distinctes lorsqu'elle est limitée par les propriétés cinétiques de la rubisco (A_c), la régénération du RuBP (A_j) ou l'utilisation des trioses-phosphate (A_p).

D'après : Sharkey *et al*. (2007) *Plant, Cell and Environment*, **30** (9) : 1035–1040.
Outil de calcul en ligne : http://www.blackwellpublishing.com/plantsci/pcecalculation/

III.7.2. Ajustement du modèle

La méthode d'ajustement utilisée ici est celle proposée par Sharkey et al. (2007). Cette méthode permet d'ajuster à partir des courbes A/C_i les cinq paramètres suivants :

- V_{cmax}, vitesse maximale de carboxylation du RuBP par la rubisco,
- J_{max}, densité maximale du flux d'électrons photosynthétiques,
- TPU, utilisation des trioses-phosphate,
- R_d, respiration mitochondriale de jour,
- g_m, conductance du mésophylle pour le CO_2.

La conductance du mésophylle pour le CO_2 (g_m) a été déterminée pour chaque courbe A/C_i individuelle en utilisant la relation suivante :

$$g_m = \frac{A}{C_i - C_c} \quad (23)$$

C_i représente la pression partielle de CO_2 dans le mésophylle (en Pa), calculée à partir de la concentration en CO_2 dans le mésophylle (c_i en ppm) et de la pression atmosphérique mesurée au moment de l'établissement de la courbe A/C_i. C_c correspond à la pression partielle en CO_2 dans les chloroplastes, estimée à partir de c_i et du coefficient de diffusion du CO_2 en phase liquide. Pour chaque courbe A/C_i, une courbe $g_m = f(C_c)$ a été générée, permettant une estimation de g_m pour chaque feuille considérée (voir figure 31). Cette valeur fixe de g_m est ensuite implémentée dans le modèle d'ajustement des courbes A/C_i, permettant de déterminer les quatre autres paramètres (V_{cmax}, J_{max}, TPU, R_d).

Cette détermination repose sur la transformation préalable des valeurs de concentration en CO_2 dans le mésophylle (C_i) en valeurs de concentration en CO_2 dans les chloroplastes (C_c) selon la relation suivante :

$$C_c = C_i - \frac{A}{g_m} \quad (24)$$

En utilisant C_c plutôt que C_i, l'assimilation nette de CO_2 limitée par la rubisco (A_c), par la régénération du RuBP (A_j) et par l'utilisation des trioses-phosphate (A_P) est donnée par :

$$A_c = V_{cmax}\left[\frac{(C_c - \Gamma^*)}{C_c + K_c\left(1 + \frac{O}{K_o}\right)}\right] - R_d \quad (25)$$

$$A_j = J_{max}\left[\frac{(C_c - \Gamma^*)}{(4C_c + 8\Gamma^*)}\right] - R_d \quad (26)$$

Tableau 2 :
Paramètres d'ajustement du modèle photosynthétique de Farquhar - Von Caemmerer.
Les valeurs des paramètres sont issues des publications suivantes : Jordan & Ogren 1984, Harley & Tenhunen 1991, Niinemets & Tenhunen 1997.

Paramètre	**Définition**	**Valeur**	**Unité**
O	Pression partielle d'O_2 dans le mésophylle	21000	Pa
R	Constante des gaz parfaits	8,314	$J.K^{-1}.mol^{-1}$
α	Rendement quantique apparent	0,24	-
K_c (25°C)	Constante de Michaelis de la carboxylation	400	µbar
ΔH_a (K_c)	Energie d'activation de la carboxylation	70000	$J.mol^{-1}$
c (K_c)	Facteur d'ajustement de la réponse de K_c à la température	35,79	-
K_o (25°C)	Constante de Michaelis de l'oxygénation	250000	µbar
ΔH_a (K_o)	Energie d'activation de l'oxygénation	15000	$J.mol^{-1}$
c (K_o)	Facteur d'ajustement de la réponse de K_o à la température	9,59	-
S (25°C)	Spécificité apparente de la rubisco pour le CO_2 par rapport à l'O_2	2710	-
ΔH_a (S)	Energie d'activation de S	-29000	$J.mol^{-1}$
c (S)	Facteur d'ajustement de la réponse de S à la température	-3,949	-
ΔH_a (R_d)	Energie d'activation de la respiration de jour	1000	$J.mol^{-1}$

$$A_P = 3TPU - R_d \quad (27)$$

Un exemple de courbe A/C_c est donné dans la figure 31. Les valeurs des paramètres utilisés ici, présentées dans le tableau 2, ont été tirées de la littérature (Jordan & Ogren 1984, Harley & Tenhunen 1991, Niinemets & Tenhunen 1997). Les paramètres associés aux propriétés cinétiques de la rubisco (K_c, K_o et τ) sont considérés comme constants entre espèces de plantes supérieures. Leur sensibilité à la température est décrite par la relation suivante :

$$\text{paramètre}(K_c, K_o, \tau) = e^{(c - \frac{\Delta H_a}{RT})} \quad (28)$$

où ΔH_a est l'énergie d'activation de la réaction ($J.mol^{-1}$), R la constante des gaz parfaits (8,31 $J.K^{-1}.mol^{-1}$), T la température absolue de la feuille (K) et *c* un facteur d'ajustement.

L'ajustement à la température des paramètres V_{cmax} et J_{max} prend en compte l'existence d'une phase initiale de réponse croissante jusqu'à une température seuil au-dessus de laquelle débute la désactivation de la rubisco :

$$\text{paramètre}(V_{cmax}, J_{max}) = \frac{e^{(c - \frac{\Delta H_a}{RT})}}{1 + e^{(\frac{T\Delta S - \Delta H_d}{RT})}} \quad (29)$$

où ΔH_d représente l'énergie de désactivation de la réaction ($J.mol^{-1}$) et ΔS un terme d'entropie ($J.K^{-1}.mol^{-1}$).

III.7.3. Mesures

Les courbes de réponse de l'assimilation nette en CO_2 (*A*) à la variation de la concentration intracellulaire en CO_2 (C_i) ont été réalisées à l'aide de deux appareils de mesure d'échanges gazeux LI-6400 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Dans ce système ouvert, la mesure de *A* et de la transpiration repose sur la mesure des concentrations en CO_2 et en vapeur d'eau par l'intermédiaire d'analyseurs de gaz à infra-rouge (IRGA). Ces IRGA, placés dans la tête de mesure et non dans le corps de l'appareil, mesurent les concentrations en CO_2 et en vapeur d'eau dans le flux d'air sortant de la chambre de mesure contenant la surface foliaire étudiée. Ces concentrations sont comparées à celles mesurées dans le flux d'air sortant d'une chambre de référence située elle-aussi dans la tête de mesure. La différence entre les deux mesures permet ainsi de déterminer l'assimilation nette en CO_2 et la transpiration de la surface foliaire étudiée.

L'assimilation nette est déterminée en régime permanent avec une PPFD saturante de 1000 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Les mesures sont réalisées à une concentration en CO_2 décroissant de 900 à 50 ppm. La C_i est calculée selon un modèle empirique à partir de la conductance stomatique, elle-même dérivée de la transpiration selon les relations décrites par Von Caemmerer et Farquhar (1981) :

$$C_i = \frac{(g_{tc} - \frac{E}{2})C_a - A}{g_{tc} + \frac{E}{2}} \qquad (30)$$

où g_{tc} est la conductance foliaire totale pour le CO_2, E le taux d'évapotranspiration et C_a la concentration en CO_2 dans la chambre de mesure. Le paramètre g_{tc} est donné par la relation :

$$g_{tc} = \frac{1}{\frac{1,6}{g_s} + \frac{1,37k_f}{g_{cl}}} \qquad (31)$$

où g_s est la conductance stomatique pour la vapeur d'eau et g_{cl} celle de la couche limite (fixée à 1,42 mol.m^{-2}.s^{-1}). Le rapport de diffusivité du CO_2 par rapport à la vapeur d'eau vaut 1,6 au niveau des stomates et 1,37 pour la couche limite. Comme indiqué plus haut, le coefficient k_f, basé sur le ratio stomatique qui représente le rapport de la conductance stomatique d'une face de la feuille par rapport à l'autre face, vaut ici 1. La respiration à l'obscurité (R_n) est déterminée en fin de mesure en mesurant l'assimilation nette à 400 ppm en CO_2 à l'obscurité.

Les mesures ont été réalisées au laboratoire à 10, 20 et 35 jours de traitement, sur trois arbres par traitement à 10 et 20 jours et quatre arbres par traitement à 35 jours. Une feuille par arbre et par étage foliaire est étudiée. Les FE ne sont prises en compte qu'à 20 et 35 jours.

III.8. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

III.8.1. Principe

Lorsqu'un quanta d'énergie lumineuse est absorbé par une molécule de chlorophylle, la totalité de cette énérgie est transférée à ses électrons de valence. Ces électrons « excités » retournent à leur état initial en libérant l'énergie absorbée de trois manières : photochimie (P), dissipation sous forme de chaleur (H) et ré-émission de fluorescence (F). Comme ces trois phénomènes entrent en compétition, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne peut donner des informations sur les deux autres processus (Maxwell & Johnson 2000). Cette relation peut s'écrire :

$$P + H + F = 1 \quad (32)$$

où P, H et F représentent la fraction de l'énergie lumineuse absorbée utilisée par les trois voies citées plus haut. Lorsque l'intensité lumineuse augmente, P diminue alors que H et F augmente. Pour une intensité lumineuse saturante, H et F atteignent leur valeur maximale et P est nulle. On a alors les relations suivantes :

$$H_m + F_m + 0 = 1 \quad (33)$$

$$H_m = 1 - F_m \quad (34)$$

On considère que le rapport entre la dissipation en chaleur et la ré-émission de fluorescence est constant :

$$\frac{H}{F} = \frac{H_m}{F_m} \quad (35)$$

On peut ainsi écrire :

$$H = \frac{F(1-F_m)}{F_m} \quad (36)$$

À partir des relations a) et e), P est donnée par :

$$P = \frac{F_m - F}{F_m} \quad (37)$$

En mesurant la fluorescence chlorophyllienne avec une intensité lumineuse saturante (F_m) et non-saturante (F), on peut déterminer la proportion de l'énergie lumineuse utilisée par la photochimie et dissipée sous forme de chaleur. La mesure de la fluorescence chlorophyllienne, qui représente seulement 1 à 2 % de l'énergie lumineuse absorbée, repose sur la différence entre la longueur d'onde d'émission de fluorescence et celle de la lumière absorbée. De façon simplifiée, il suffit d'exposer la surface foliaire étudiée à une source lumineuse de longueur d'onde connue et de mesurer la quantité de lumière ré-émise à des longueurs d'onde supérieures.

Lorsque la fluorescence chlorophyllienne est mesurée avec une intensité lumineuse non-saturante sur une surface foliaire adaptée à la lumière et présentant une photosynthèse en régime constant, la relation (37) s'écrit :

$$P_{lumière} = \Phi_{PSII} = \frac{F_m^{'} - F_s}{F_m^{'}} \quad (38)$$

où F'_m représente la fluorescence chlorophyllienne maximale d'une feuille adaptée à la lumière et F_s la fluorescence chlorophyllienne mesurée lorsque la photosynthèse fonctionne en régime

constant. $P_{lumière}$ correspond à la fraction de l'énergie lumineuse utilisée par la photochimie pour une feuille adaptée à la lumière. Ce paramètre, aussi appelé rendement quantique du PSII, s'écrit généralement Φ_{PSII} (Genty *et al.* 1989). On observe une forte corrélation entre Φ_{PSII} et l'efficacité de l'assimilation du CO_2 (Maxwell & Johnson 2000), mais cette corrélation tend à disparaître dans certaines conditions de stress (Fryer *et al.* 1998). En plus de donner des indications sur l'efficacité globale de la photosynthèse, Φ_{PSII} permet de déterminer le flux total d'électrons transitant par le PSII (J_T, voir section suivante) qui décrit la capacité photosynthétique globale *in vivo* (Genty *et al.* 1989).

Un autre paramètre associé à la photochimie peut être déterminé à l'aide de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Il s'agit du *quenching* photochimique (qP), donné par la relation suivante :

$$qP = \frac{(F_m' - F_s)}{(F_m' - F_o')} \qquad (39)$$

Alors que Φ_{PSII} correspond à la proportion de l'énergie lumineuse absorbée utilisée par la photochimie, qP décrit la proportion de centres réactionnels du PSII ouverts. Un centre réactionnel est dit ouvert lorsque des accepteurs d'électrons situés en aval dans la chaîne de transfert d'électrons, en particulier la plastoquinone de type Q_A, sont disponibles. Φ_{PSII} et qP sont reliés par un troisième paramètre, F_v/F_m, qui représente le rendement quantique maximal du PSII en considérant que tous les centres réactionnels sont ouverts (Genty *et al.* 1989) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m' - F_o'}{F_m'} = \frac{\Phi_{PSII}}{qP} \qquad (40)$$

Si Φ_{PSII} donne des indications relatives à l'efficacité globale de la photochimie, qP et F_v/F_m apportent des informations quant aux processus qui peuvent altérer celle-ci (Maxwell & Johnson 2000). Une modification de qP peut être causée par la fermeture des centres réactionnels du PSII, ce qui indique une saturation de la photochimie par la lumière. Une modification de F_v/F_m peut quant à elle provenir de l'altération de l'efficacité du *quenching* non-photochimique.

III.8.2. Mesures

La fluorescence chlorophyllienne a été mesurée *in vivo* au moyen d'un système de mesure d'échanges gazeux couplé à un fluorimètre LI-6400-40 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Les mesures ont été réalisées au laboratoire à 10, 21, 28 et 35 jours de traitement, sur quatre arbres par traitement. Les mesures sont réalisées sur des feuilles adaptées à la lumière, avec une PPFD de 1000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Lorsque la photosynthèse atteint un régime constant, une mesure de l'assimilation nette (A), de la conductance stomatique (g_s), de la concentration

intracellulaire en CO_2 (C_i) et de la fluorescence chlorophyllienne à régime constant (F_s) est réalisée. Un flash lumineux saturant est ensuite appliqué pendant une seconde, avec un PPFD supérieur à 10000 µmol.m^{-2}.s^{-1}, et la fluorescence chlorophyllienne maximale (F'_m) est mesurée. Puis l'échantillon est laissé à l'obscurité pendant quelques minutes pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne minimale (F'_o) et de la respiration à l'obscurité (R_n).

III.8.3. Estimation de la photorespiration

La densité du flux total d'électrons à travers le PSII (J_T) est donnée par la relation suivante :

$$J_T = \Phi_{PSII}.Q.f.\alpha \qquad (41)$$

Q correspond à la densité du flux de photons incident en µmol.m^{-2}.s^{-1}. Le coefficient *f* représente la fraction des quanta absorbés utilisée par le PSII. Ce coefficient vaut 0,5 en conditions normales chez les plantes en C_3 comme le peuplier. Nous avons considéré que cette valeur n'était pas modifiée par le traitement à l'ozone, comme cela a été démontré chez le bouleau (*Betula pendula* Roth) (Eichelmann *et al.* 2004). L'absorbance foliaire est déduite des mesures réalisées au chlorophylle-mètre CCM-200. Bauerle *et al.* (2004) ont établi une relation entre l'absorbance foliaire mesurée à l'aide d'un spectroradiomètre (LI-1800 avec sphère intégratrice 1800-12S) et la teneur en chlorophylle déterminée au moyen du chlorophylle-mètre Minolta SPAD 502 :

$$\alpha = 89{,}2 - 56{,}8.e^{-0{,}0723(SPAD)} \qquad r^2 = 0{,}94 \qquad (42)$$

Cette relation a été déterminée sur 338 échantillons foliaires provenant de cinq espèces ligneuses (*P. trichocarpa* × *deltoides*, *Acer rubrum*, *Prunus persica*, *Quercus shumardii*, *Prunus serotina*).

Le fonctionnement du SPAD 502 est proche de celui du CCM-200 utilisé dans cette étude. Les valeurs de teneur en chlorophylle déterminées par ces deux appareils sont reliées par une relation curvilinéaire du troisième ordre (Richardson *et al.* 2002) :

$$CCI = 0.964 + 0.185.SPAD - 0.002.SPAD^2 + 0.0002.SPAD^3 \qquad r^2 = 0{,}97 \qquad (43)$$

Cette relation a été établie à partir de l'analyse de 100 feuilles de bouleau à papier (*Betula papyrifera* Marsh.). En utilisant ces deux relations, les valeurs de CCI mesurées au CCM-200 ont pu être utilisées pour estimer l'absorbance foliaire dans nos échantillons.

Le flux d'électrons photosynthétiques (J_T) est partagé entre les activités de carboxylation et d'oxygénation de la rubisco. En considérant comme négligeables les autres voies de consommation d'électrons photosynthétiques, on peut écrire :

$$J_T = J_C + J_O \quad (44)$$

où J_C et J_O correspondent aux flux d'électrons destinés respectivement à la carboxylation et l'oxygénation du RuBP. Dans les tissus foliaires des espèces en C_3 en conditions naturelles, trois processus concourent à l'utilisation du pouvoir réducteur et donc des électrons photosynthétiques : l'assimilation nette de CO_2 (A), la respiration mitochondriale de jour (R_d) et la photorespiration (P_r). Sachant que quatre électrons sont nécessaires à la réduction d'une molécule de CO_2 fixée, on peut établir la relation suivante :

$$(A + R_d + P_r) = \frac{1}{4} J_C \quad (45)$$

où A, R_d et P_r représentent la densité de flux de CO_2 libéré par chacune des trois voies citées, exprimées en $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Sachant que quatre électrons sont consommés par cycle d'oxygénation et qu'une molécule de CO_2 est relachée après deux cycles (Valentini *et al.* 1995), on peut écrire :

$$J_O = 4\ (2\ P_r) \quad (46)$$

La combinaison des équations (44), (45) et (46) permet d'aboutir à un système de trois équations à trois inconnues (J_C, J_O et Pr) (Valentini *et al.* 1995) :

$$J_C = \frac{1}{3} [J_T + 8\ (A + R_d)] \quad (47)$$

$$J_O = \frac{2}{3} [J_T - 4\ (A + R_d)] \quad (48)$$

$$P_r = \frac{1}{12} [J_T - 4\ (A + R_d)] \quad (49)$$

Ces relations permettent de calculer les paramètres J_C, J_O et P_r à partir des mesures d'échanges gazeux (A et R_d) et de la détermination du flux d'électrons total (J_T) par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne.

III.9. Analyses biochimiques

III.9.1. Extraction et dosage des protéines solubles

III.9.1.1. Extraction

Environ 300 mg de matière fraîche sont broyés dans l'azote liquide en présence de PVPP (10 % m/m) et de 3,5 mL de tampon d'extraction dont la composition est la suivante :

Tampon HEPES-KOH pH 7,5 (100 mM), PVP 25 (6 % m/m), PEG 20 (7 % m/m), DTT (2 mM), $MgCl_2$ (5 mM), EGTA (5 mM), Glycérol (10 % v/v), Pepstatine (1 µM), Leupeptine (1 µM)

Les extraits sont centrifugés durant 20 minutes à 36 000 *g* et 4°C (centrifugeuse Beckman Avanti 30, Rotor F-1010). Le volume de surnageant est mesuré et les extraits sont temporairement stockés dans la glace.

III.9.1.2. Filtration des extraits végétaux

Les extraits bruts sont dessalés par passage sur colonne Sephadex G25 (Pharmacia PD-10, Orsay, France). Un volume d'extrait de 2,5 mL est ainsi filtré puis élué avec 3,5 mL de tampon d'élution de composition :

Tampon HEPES-KOH pH 7,5 (100 mM), DTT (2 mM), $MgCl_2$ (5 mM), Glycérol (10 % v/v)

L'éluat est aliquoté et stocké à -80°C avant d'être analysé. Les mesures de concentration en protéines solubles et d'activités enzymatiques sont réalisées sur cet éluat.

III.9.1.3. Quantification des protéines solubles

Le principe du dosage des protéines solubles est basé sur le déplacement d'absorption du bleu de Coomassie de 465 à 595 nm lorsqu'il se complexe à une protéine (Bradford 1976) :

Forme cationique	↔	Forme neutre	↔	Forme anionique (fixe les protéines)
465 nm		650 nm		595 nm

Le dosage est effectué à l'aide d'un lecteur de microplaques de modèle ELx 808 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Dans des microplaques comportant 96 puits de 300 µL, le mélange suivant est réalisé : 80 µL d'eau distillée, 80 µL d'extrait protéique dilué 100 fois et 40 µL de réactif Biorad. La plaque est agitée durant 20 secondes afin d'homogénéiser le mélange, puis laissée à incuber 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 595 nm. Sur chaque plaque, une gamme étalon de sérum albumine bovine (SAB) est réalisée, dans une gamme de concentration allant de 0 à 15 $\mu g.mL^{-1}$. Deux répétitions sont effectuées pour chaque échantillon.

III.9.2. Activités enzymatiques spécifiques

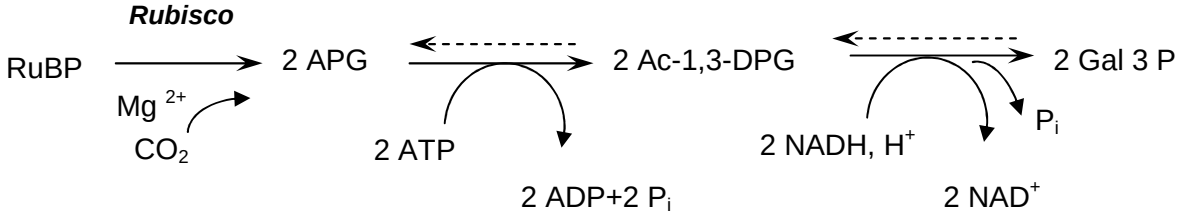
III.9.2.1. Principe des mesures

Les mesures d'activités enzymatiques sont toutes basées sur la variation d'absorbance d'un composé donné à une longueur d'onde donnée. Pour la rubisco, la phosphoénolpyruvate

carboxylase (PEPc) et l'hydroxypyruvate réductase (HPR), les mesures sont basées sur le couplage des réactions qu'elles catalysent à l'oxydation du NADH. Le passage de l'état réduit du noyau nicotinamide à sa forme oxydée entraîne une diminution de son absorbance spécifique à 340 nm. La quantification du nombre de molécules de NADH oxydées permet de déterminer la quantité de substrat transformée par chaque enzyme en un temps et pour une quantité de protéines donnés. Les mesures d'activité de la glycolate oxydase (GO) et la glutamine synthétase (GS) sont basées sur la formation d'autres composés (respectivement la glyoxylate phénylhydrazone et le γ-glutamylhydroxamate). Pour chaque extrait, un dosage témoin et deux essais sont réalisés.

III.9.2.2. Rubisco, activité carboxylase totale (EC 4.1.1.39)

On mesure ici la capacité *in vitro* de l'enzyme à catalyser la réaction de fixation d'une molécule de CO_2 à une molécule de ribulose bisphosphate (RuBP) selon le mécanisme réactionnel suivant :



Le milieu réactionnel utilisé a la composition suivante (Pelloux *et al.* 2001) :

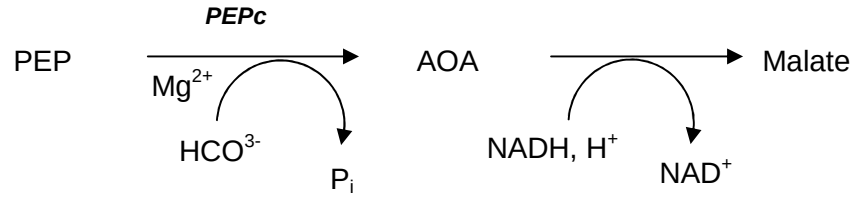
Bicine-KOH pH 8 (100 mM), ATP (3,5 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), NADH (0,25 mM), CP (5 mM), CPK (5 $U.mL^{-1}$), $MgCl_2$ (20 mM), Gal-3-PDH (5 $U.mL^{-1}$), 3-PGK (5 $U.mL^{-1}$)

La réaction enzymatique est déclenchée par addition de RuBP (0,5 mM).

Pour déterminer l'activité totale, le mélange extrait brut est incubé dans le milieu réactionnel au bain-marie à 30°C durant 15 minutes avant d'ajouter le RuBP. Cette étape a pour but d'activer l'ensemble des enzymes présentes dans l'extrait grâce à une température et une teneur en CO_2 optimales. Le dosage est effectué à l'aide d'un lecteur de microplaques de modèle ELx 808 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

III.9.2.3. Phosphoénolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31)

Cette enzyme catalyse la fixation du CO_2 dissous dans le cytosol sous forme de HCO_3^- sur le phosphoénolpyruvate pour former de l'acide oxaloacétique (AOA). Le dosage de cette enzyme est basé sur la réaction couplée entre la formation d'AOA et celle du malate, qui fait intervenir une oxydation de NADH :



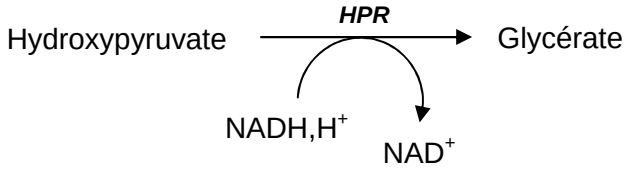
Le milieu réactionnel utilisé est le suivant (Fontaine *et al.* 2003) :

Tris-HCl pH 8 (112,5 mM), $MgCl_2$ (5 mM), $NaHCO_3$ (5 mM), NADH (0,2 mM), G6P (2 mM), MDH (3 $U.mL^{-1}$)

La réaction est déclenchée instantanément par ajout de PEP (4 mM) au mélange extrait brut + milieu de dosage, et l'activité de l'enzyme est suivie durant 15 minutes à 30°C après 3 minutes d'incubation à l'obscurité. Le dosage est effectué à l'aide d'un lecteur de microplaques de modèle ELx 808 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

III.9.2.4. Hydroxypyruvate réductase (EC 1.1.1.29)

Cette enzyme péroxysomale catalyse la réduction de l'hydroxypyruvate en glycérate. Le dosage est basé sur la consommation de NADH associée à la réaction :



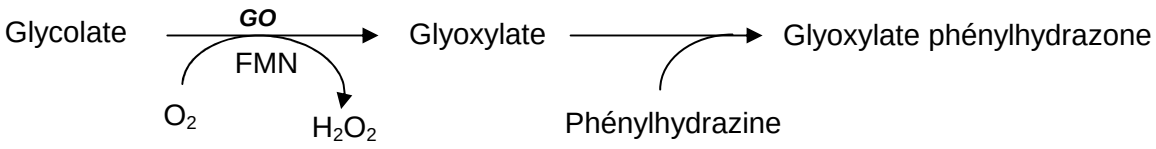
Le milieu réactionnel suivant est utilisé :

KH_2PO_4 / Na_2PO_4 pH 5,8 (50 mM), NADH (0,33 mM)

La réaction est déclenchée par ajout d'hydroxypyruvate-KOH pH 5,8 (4 mM). L'activité est mesurée à 30°C durant 10 minutes après 3 minutes d' incubation à l'obscurité, au moyen d'un lecteur de microplaques de modèle ELx 808 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

III.9.2.5. Glycolate oxydase (EC 1.1.3.1.)

Cette enzyme catalyse la formation de glyoxylate et d'eau oxygénée à partir de glycolate et de dioxygène, en présence de son cofacteur la flavine mononucléotide (FMN). Le dosage est basé sur la réaction spontanée entre le glyoxylate et la phénylhydrazine qui produit le glyoxylate phénylhydrazone, un composé qui absorbe dans les UV à 324 nm :



La composition du milieu réactionnel est la suivante :

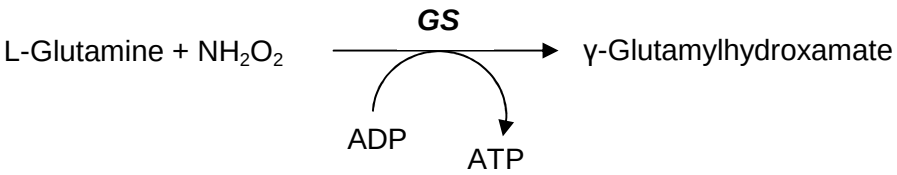
Bicine-KOH pH 8 (100 mM), Phénylhydrazine (3,3 mM), FMN (10 µM)

La réaction est déclenchée par l'ajout d'acide glycolique-KOH pH 7 (5 mM).

L'augmentation de l'absorbance est suivie durant 10 minutes, après 3 minutes d'incubation à l'obscurité. Le dosage est réalisé au moyen d'un spectrophotomètre Beckman DU 640 (Beckman Coulter France, Villepinte, France).

III.9.2.6. Glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), activité transférasique

In vivo, la glutamine synthétase (GS) participe à l'assimilation primaire de l'azote et catalyse la biosynthèse de glutamine à partir de glutamate (activité biosynthétique). *In vitro*, l'activité GS catalysant la réaction inverse (activité transférasique) peut être dosée par une méthode colorimétrique selon la réaction suivante :



En présence de $FeCl_3$, le γ-glutamylhydroxamate forme un complexe coloré brun dont la densité optique est mesurée à 540 nm. La quantité de produit formée est déterminée à partir d'une courbe-étalon réalisée avec des concentrations croissantes en γ-glutamylhydroxamate.

Le milieu réactionnel a la composition suivante :

Tris-HCl pH 7,2 (50 mM), $MgSO_4$ (20 mM), Hydroxylamine (30 mM), Na_2EDTA (4 mM), Arsenate de K^+ (20 mM), L-Glutamine (125 mM), ADP (0,5 mM)

Des témoins sont réalisés en absence d'ADP. La réaction se déroule à 30℃ pendant 30 min et est stoppée par l'addition de 1 mL d'une solution contenant : FeCl3 (0,37 M), TCA (0,2 M) et HCl (0,67 M). Les échantillons sont laissés 20 minutes à température ambiante, sans agitation, avant la mesure de densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640 (Beckman Coulter France, Villepinte, France).

III.9.2.7. Calcul des activités spécifiques

Les activités enzymatiques spécifiques (AS) sont exprimées en nanokatal. Un nanokatal correspond au nombre de nanomoles de substrat transformées par seconde et par milligramme de protéines solubles.

Chaque substrat est caractérisé par son coefficient d'extinction molaire ε, qui correspond à la variation d'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée, pour un trajet optique de 1 cm, provoquée par la transformation d'une nanomole de ce composé par mL.

ε (NADH) = 0,00622 ε (Phenylhydrazone) = 0,017

L'activité spécifique de l'enzyme (AS) est calculée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO.min^{-1} \times \varepsilon \times 10^3}{V_{extrait} \times C_{prot} \times 60} \quad (50)$$

où $V_{extrait}$ réprésente le volume d'extrait et C_{prot} la concentration en protéines solubles de l'extrait. Les facteurs 10^3 et 60 permettent de revenir à des nanomoles de substrat transformé en une seconde.

III.9.3. Révélation sur gel de l'activité glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.)

Environ 300 mg de matière fraîche foliaire sont broyés dans l'azote liquide en présence de PVPP (10 % m/m) et de 2,5 mL de tampon d'extraction dont la composition est la suivante :

Tampon-HCl pH 7,4 (100 mM), $MgCl_2$ (1 mM), β-mercaptoéthanol (5 % v/v)

Les extraits sont centrifugés durant 30 minutes à 14 000 *g* et 4°C (centrifugeuse Beckman Avanti 30, Rotor F-1010). La concentration en protéines solubles et l'activité spécifique totale de la GS sont mesurées dans le surnageant selon les méthodes décrites précédemment.

Les extraits obtenus sont séparés à 4°C par électrophorèse en condi tions natives au moyen d'un système Bio-Rad Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, France). La séparation est réalisée à 90 V par gel de 1,5 mm d'épaisseur. La concentration en acrylamide/polyacrylamide des gels de concentration et de résolution est respectivement de 4,5 % et 6 %. Après 2 à 3 heures de migration, les gels sont incubés pendant 1h30 à 40°C dans le milieu réactionnel suivant :

Tris-HCl pH 7,2 (50 mM), $MgSO_4$ (20 mM), Hydroxylamine (60 mM), Na_2EDTA (4 mM), Arsenate de K^+ (20 mM), L-Glutamine (250 mM), ADP (1 mM).

À l'issue de la période d'incubation, la réaction GS est stoppée en versant à la surface des gels une solution ferrique dont la composition est la suivante :

FeCl3 (0,37 M), TCA (0,2 M) et HCl (0,67 M).

En présence de $FeCl_3$, le γ-glutamylhydroxamate produit par l'activité GS forme un complexe coloré brun.

III.9.4. Immunodétection de la GDC H et de la SHMT

III.9.4.1. Préparation des extraits protéiques dénaturés

Environ 200 mg de matière fraîche sont broyés dans l'azote liquide en présence de PVPP (10 % m/m) et dilués dans 2 mL d'un tampon d'extraction dont la composition est la suivante :

KH_2PO_4 / Na_2PO_4 pH 7,5 (62,5 mM), SDS (2 % m/v), Glycérol (10 % v/v), Bleu de bromophénol (0,001 % m/v), β-mercaptoéthanol (5 % v/v)

Les extraits sont centrifugés durant 20 minutes à 16 000 *g* et 4°C (centrifugeuse Beckman Avanti 30, Rotor F-2402). La concentration en protéines solubles est déterminée dans le surnageant en prenant en compte la présence de β-mercaptoéthanol à l'aide des réactifs Bio-Rad D_C (Lowry *et al.* 1951). Les extraits sont maintenus pendant 5 min à 100°C de façon à dénaturer les protéines.

III.9.4.2. Séparation par SDS-PAGE et transfert sur membrane

Des quantités égales de protéines solubles (75 µg) sont séparées par SDS-PAGE (*SDS – polyacrylamide gel electrophoresis*) à l'aide d'un système Bio-Rad Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, France). La séparation est réalisée à 90 V par gel de 0,75 mm d'épaisseur. La concentration en acrylamide/polyacrylamide des gels de concentration et de résolution est respectivement de 4,5 % et 10 %.

Les protéines séparées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher & Schuell - Whatman, Dassell, Allemagne) à 4 $mA.cm^{-2}$ au moyen d'un système de transfert semi-sec (Trans-Blot SD, Bio-Rad). Après coloration au rouge Ponceau, la membrane est conservée pendant la nuit à 4°C sous agitation modérée dans une solution de blocage dont la composition est la suivante :

SAB (2 % m/v), lait en poudre (2 % m/v), Tris-HCl pH 7,6 (20 mM), NaCl (0,5 M), Tween 20 (0,05 % v/v).

L'étape de blocage permet de saturer la surface de la membrane et ainsi d'éviter l'hybridation aspécifique des anticorps primaires et secondaires.

III.9.4.3. Immunodétection des protéines

Après rinçage dans la solution de blocage, la membrane est incubée pendant 2 h à température ambiante sous agitation modérée dans la solution de blocage additionnée des anticorps dirigés contre la sous-unité H du complexe glycine decarboxylase (GDC, EC 2.1.2.10) et la sérine hydroxymethyltransferase (SHMT, EC 2.1.2.1), dilués respectivement 10000 et 15000 fois. Les deux types d'anticorps sont des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre des protéines purifiées à partir de feuilles d'épinard (Agrisera, Vännäs, Sweden).

La membrane est à nouveau rincée dans la solution de blocage puis incubée 1 h dans cette même solution additionnée des anticorps secondaires dilués 3000 fois. Ces anticorps dirigés contre les IgG de lapin sont couplés à une péroxydase fixée au niveau de leur partie constante.

Après rinçage dans une solution identique à la solution de blocage sans lait ni SAB, la révélation du signal de chémiluminescence produit par l'activité de la péroxydase conjuguée aux anticorps secondaires est réalisée au moyen du kit Western Lightning Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA). Le signal est enregistré sur des films d'autoradiographie (Amersham Biosciences UK, Ltd.) en utilisant les solutions de fixation et de révélation Kodak GBX (Carestream Health, Inc.). Les films sont ensuite scannés à l'aide d'un systéme d'acquisition Gel Doc XR et analysés avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad Laboratories). La masse moléculaire des bandes révélées est estimée en comparaison des marqueurs de masse moléculaire Precision Plus (Bio-Rad Laboratories).

III.10. Traitement statistique

Le traitement statistique des données physiologiques a été réalisé à l'aide du logiciel SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

III.10.1. Comparaison d'échantillons

La comparaison de deux échantillons est effectuée au moyen du test *t* de Student pour échantillons indépendants au seuil de risque α de 0,05. Au préalable, un test de Levene pour l'égalité des variances dans les deux échantillons est réalisé à α = 0,05. Si l'égalité des variances n'est pas vérifiée, les échantillons sont comparés à l'aide un test non paramétrique U de Mann-Whitney (α = 0,05). La comparaison de plus de deux échantillons est réalisée par une analyse de la variance (ANOVA univariée) au seuil de risque α de 0,05, suivie du test *post hoc* de Scheffe (α = 0,05). Les variations avec le temps d'une série de données sont évaluées de cette manière.

III.10.2. Relation linéaire

La relation entre deux variables est testée par régression linéaire. Le niveau de signification de la liaison entre la variable dépendante et la variable explicative est déterminé par ANOVA, en utilisant la loi de Fisher-Snédécor.

III.10.3. Comparaison de pentes

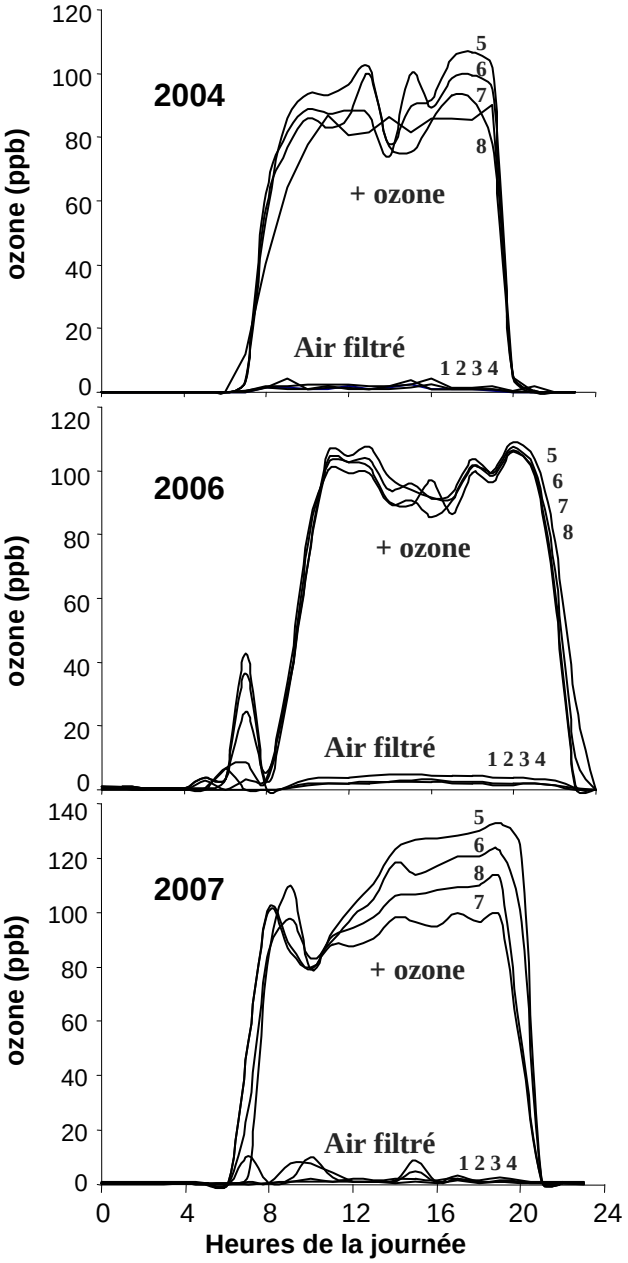
Les droites obtenues par régression linéaire sont séparées statistiquement en comparant les coefficients directeurs des deux droites à l'aide d'un test de Student. Le T est calculé de la façon suivante :

$$T = \frac{a_{FM} - a_{FJ}}{\sqrt{\left(\frac{S_{xy}^2}{S_x^2 (N-1)}\right)_{FM} + \left(\frac{S_{xy}^2}{S_x^2 (N-1)}\right)_{FJ}}} \qquad (51)$$

avec a le coefficient directeur de la droite de régression linéaire, S^2_{xy} la covariance, S^2_x la variance dans x et N l'effectif de chaque échantillon (FJ et FM). La probabilité associée au test de Student est déterminée en bilatéral à $(N_{FM} – 2) + (N_{FJ} – 2)$ degrés de liberté.

RÉSULTATS

Figure 32 : Concentration en ozone dans les chambres de fumigation lors des trois expériences réalisées (2004, 2006 et 2007). Les courbes sont dessinées à partir des moyennes horaires de concentration en ozone (en ppb) mesurée dans les huit chambres de fumigation (1 à 4 : air filtré; 5 à 8 : air filtré + ozone) à chaque heure pendant 35 jours (moyenne avec *n* = 35).



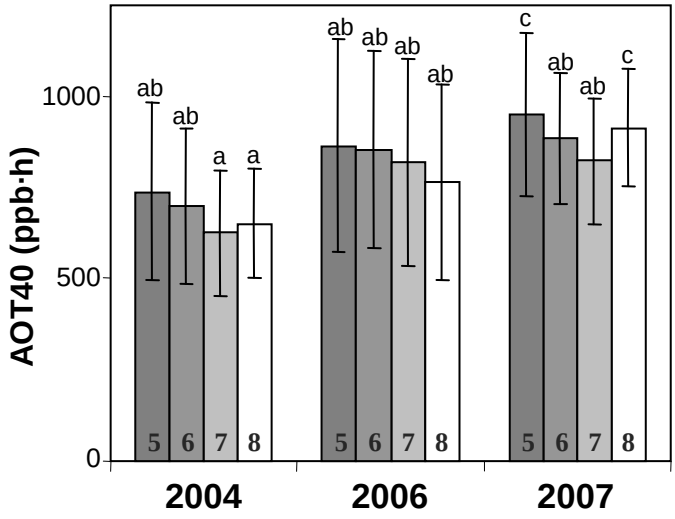


Figure 33 : Exposition à l'ozone dans les chambres de fumigation enrichies en ozone (chambres 5 à 8) lors des trois expériences réalisées (2004, 2006 et 2007). Les valeurs représentent l'AOT40 quotidien moyen (en ppb·h) sur les 35 jours de traitement (moyenne ± écart-type, *n* = 30 à 35). Les lettres indiquent les sous-groupes de moyennes égales (ANOVA suivi du test de Scheffé, α = 0,05).

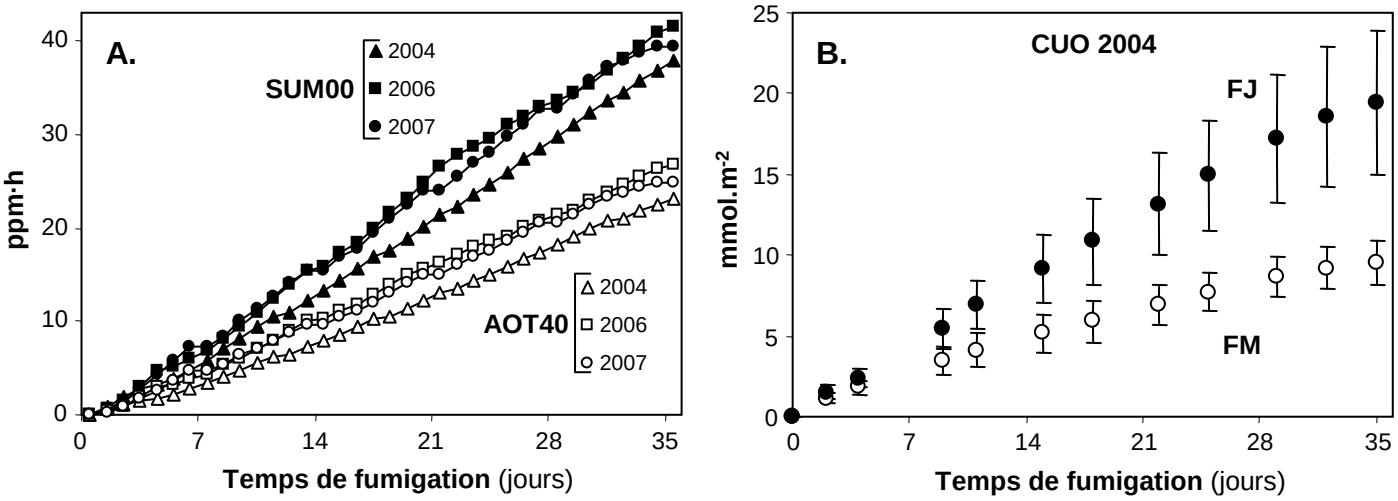


Figure 34 : Évolution des indices cumulatifs d'exposition à l'ozone au cours des trois périodes de fumigation (2004, 2006 et 2007) : **A**. SUM00 et d'AOT40 et **B**. dose cumulée d'ozone (CUO) pour l'expérience de 2004. Les valeurs de SUM00 et d'AOT40 représentent les moyennes en ppm·h des mesures dans les quatre chambres de fumigation enrichie en ozone. Le CUO a été déterminé à partir du flux stomatique pour les feuilles matures (FM) et jeunes (FJ) des peupliers traités. Pour chaque étage foliaire, moyenne et écart-type sont indiqués (*n* = 8).

RÉSULTATS

I. Fumigation

I.1. Exposition journalière

L'évolution moyenne au cours de la journée de la concentration en ozone dans les huit chambres de fumigation lors des trois expériences réalisées au cours de ce travail est présentée dans la figure 32. Les courbes sont tracées à partir des moyennes horaires de concentration en ozone pour chaque tranche horaire au cours des 35 jours de traitement. De manière générale, la concentration en ozone dans les chambres enrichies atteint un plateau moins d'une heure après le déclenchement de la production d'ozone, se maintient à ce niveau de façon plus ou moins stable pendant une dizaine d'heures et décroît rapidement après l'arrêt des générateurs d'ozone. Dans les chambres en atmosphère filtrée, la concentration en ozone demeure très faible, à l'exception de pics ponctuels ne dépassant pas 15 ppb, probablement causés par la remontée d'une partie de l'ozone présent dans les chambres enrichies dans le circuit général de ventilation lors d'interventions ponctuelles dans les chambres. Dans les chambres enrichies en ozone, la durée de la période quotidienne d'exposition est de 10 h 30 à une concentration de 90 ppb environ pour 2004 et de 10 h 30 à 100 ppb pour 2006. Le pic observé à 7 h en 2006 est la conséquence de l'interruption de la fumigation tous les deux à trois jours autour de 8 h pour intervenir dans les chambres phytotroniques et effectuer différentes mesures (chlorophylles, croissance, échanges gazeux). Pour 2007, la concentration en ozone affiche un premier pic à 100 ppb environ autour de 8 h 30 avant de diminuer à 80 ppb vers 10 h puis de se stabiliser entre 100 et 120 ppb selon les chambres pendant environ 9 h. Ces variations sont la conséquence de prélèvements foliaires réalisés pour l'extraction de chloroplastes, technique relativement longue et nécessitant l'utilisation de tissus foliaires frais. Les creux observés autour de 15h en 2004 et 2006 sont dus à l'interruption de la fumigation pour permettre des prélèvements en milieu de photopériode.

Le niveau d'exposition à l'ozone de 2004 apparaît à première vue plus faible que ceux de 2006 et 2007. Cependant, les valeurs des indices cumulés d'exposition (SUM00 et AOT40) lors des trois expériences sont assez proches.

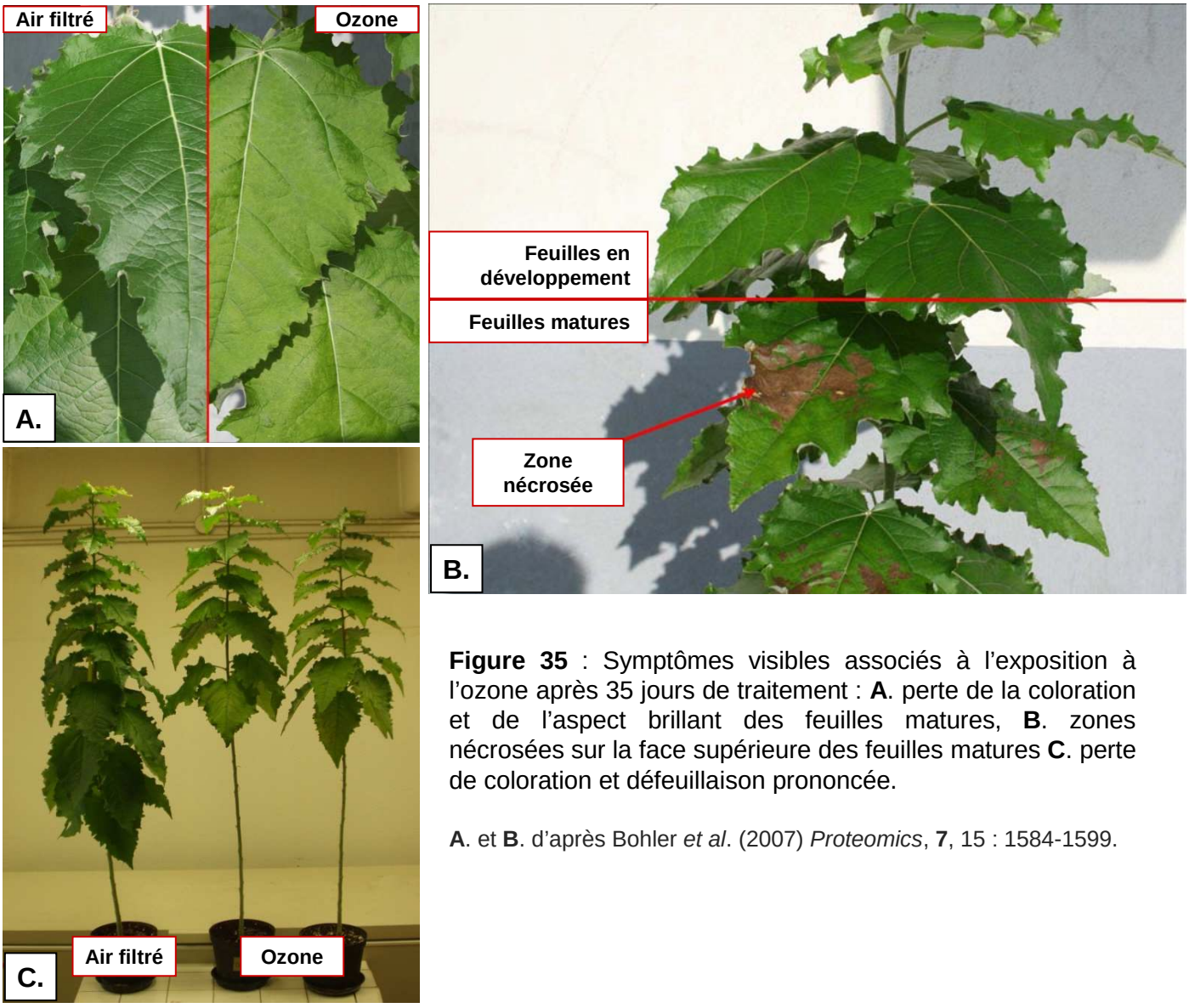


Figure 35 : Symptômes visibles associés à l'exposition à l'ozone après 35 jours de traitement : **A**. perte de la coloration et de l'aspect brillant des feuilles matures, **B**. zones nécrosées sur la face supérieure des feuilles matures **C**. perte de coloration et défeuillaison prononcée.

A. et **B**. d'après Bohler *et al*. (2007) *Proteomics*, **7**, 15 : 1584-1599.

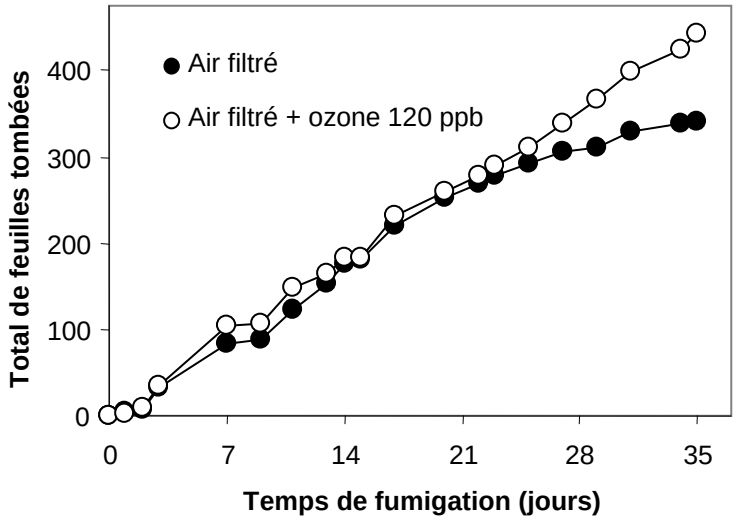


Figure 36 : Évolution du nombre total de feuilles tombées pour les arbres exposés à l'ozone (symboles ouverts) et les arbres en air filtré (symboles pleins) au cours des 35 jours de traitement, calculé pour un même nombre d'arbres dans chaque condition (0 à 14 jours : *n* = 40 ; 14 à 25 jours : *n* = 36 ; 25 à 35 jours : *n* = 32).

I.2. SUM00 et AOT40

Après 35 jours de fumigation, les arbres traités ont été exposés à un SUM00 de 37,92 ppm·h en 2004, 41,53 ppm·h en 2006 et 39,47 ppm·h en 2007 et à un AOT40 de 23,19 ppm·h en 2004, 26,68 ppm·h en 2006 et 24,77 ppm·h en 2007 (figure 34.A). Pour les deux indices, les courbes montrent une progression quotidienne régulière au cours des 35 jours de traitement. Les moyennes quotidiennes de SUM00 et d'AOT40 de 2004 sont inférieures à celle mesurées pour 2006 et 2007, mais les valeurs de ces deux indices cumulées sur l'ensemble de la période de traitement restent pour 2004 assez proches de celles de 2006 et 2007 du fait du plus grand nombre de journées complètes de fumigation (35 en 2004, contre 32 en 2006 et 30 en 2007). L'interruption des périodes de fumigation est due à l'épuisement des bouteillles d'oxygène nécessaire à la production d'ozone et au délai de leur remplacement. Pour une même expérience de fumigation, les moyennes quotidiennes de SUM00 et d'AOT40 ne diffèrent pas de manière significative d'une chambre à l'autre (ANOVA, $\alpha = 0,05$) (figure 33).

I.3. Dose d'ozone cumulée (CUO)

La dose cumulée d'ozone (CUO) associée au flux stomatique a été déterminée pour les étages foliaires FM et FJ (figure 34.B), pour lesquelles les échanges gazeux ont été mesurés sur un même échantillon de feuilles tout au long de la période de fumigation. Dans les deux types de feuilles, le CUO progresse régulièrement avec le temps, avec un infléchissement en fin de traitement plus marqué chez les FM. Dès la première semaine de fumigation, les FJ montrent un CUO supérieur à celui des FM. À 35 jours de traitement, la valeur moyenne de CUO s'élève à 9,7 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ pour les FM contre 19,9 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ pour les FJ. La différence de CUO observée entre les deux étages foliaires provient des variations de la conductance stomatique au cours du développement foliaire (cf paragraphe V.2. de la présente section).

II. Symptômes associés à l'exposition à l'ozone

II.1. Symptômes foliaires visibles

En réponse à l'exposition à l'ozone, les arbres traités ont montré des symptômes visibles foliaires de quatre types : nécroses, chlorose, perte de l'aspect brillant et sénescence accélérée (figure 35).

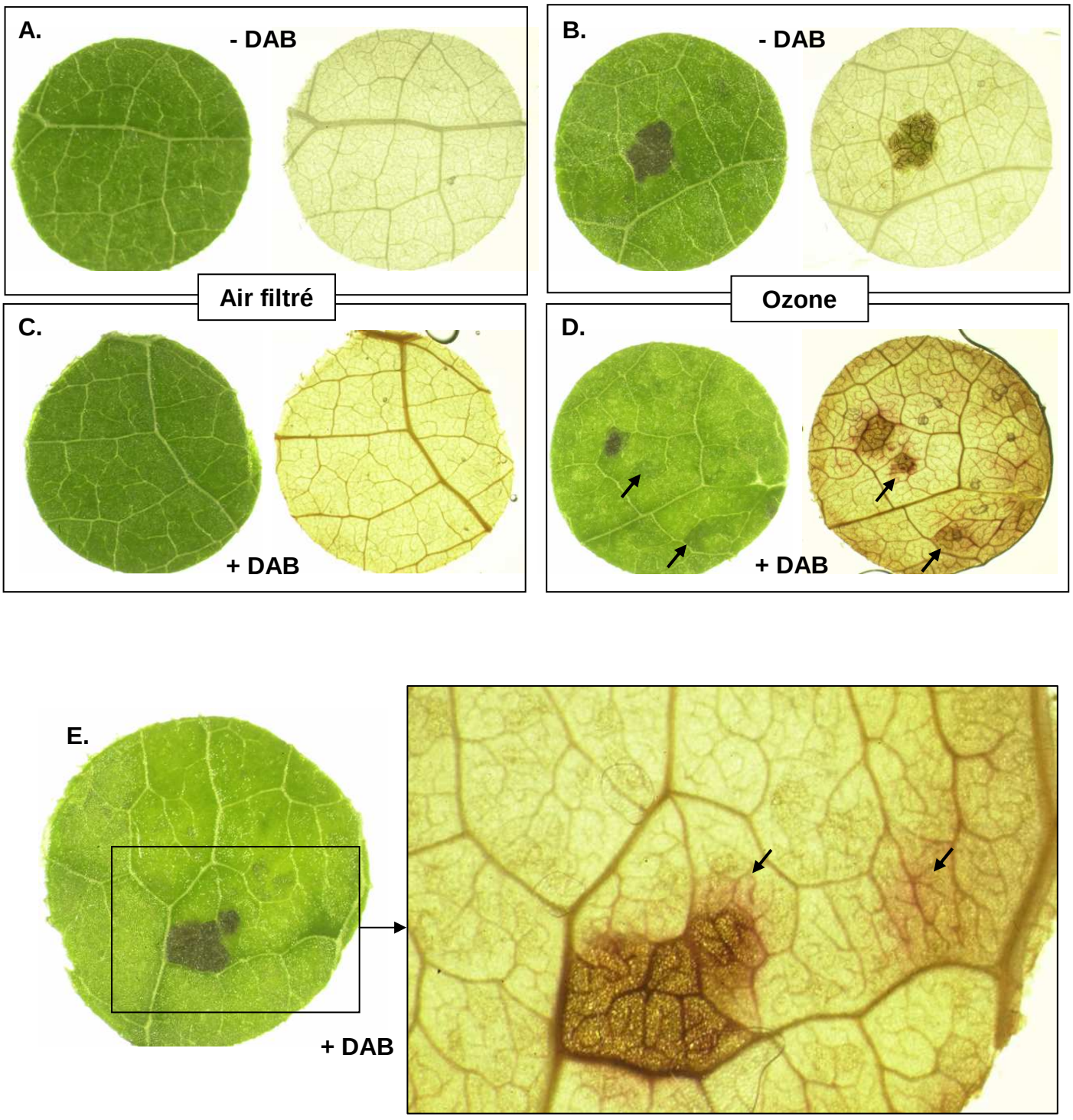


Figure 37 : Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène sur des disques foliaires prélevés à 35 jours de traitement sur des feuilles pleinement développées. Les clichés représentent des disques foliaires prélevés sur des arbres témoins (**A**. et **C**.) ou traités à l'ozone (**B**., **D**. et **E**.), avant et après décoloration à l'éthanol. En **C**., **D**. et **E**., les tissus foliaires ont été colorés au DAB pour mettre en évidence le peroxyde d'hydrogène. En **D**., les flèches indiquent des zones colorées non nécrosées. En **E**., agrandissement 4x d'une zone nécrosée ; les flèches indiquent des zones colorées en bordure de nécrose et suivant le réseau des nervures.

Les arbres exposés à l'ozone ont montré des symptômes de nécrose foliaire après 4 à 6 jours de traitement, sous la forme de tâches brun-noir sur la face supérieure des feuilles pleinement développées. De taille assez réduite au début (quelques mm² tout au plus), ces tâches ont souvent évolué en zones nécrotiques plus étendues, pouvant représenter jusqu'à 20 % de la surface foliaire en fin de traitement (soit plusieurs cm²). Les feuilles appartenant à l'étage foliaire FJ, feuilles marquées dont le développement s'est déroulé pendant la période de fumigation, n'ont montré des tâches nécrotiques qu'à partir du moment où elles ont atteint leur pleine expansion, c'est-à-dire à partir de 14 jours (cf. figure 41). Par ailleurs, les feuilles qui se sont développées au moins en partie en présence d'ozone affichaient en fin de traitement une décoloration marquée. Leur face supérieure présentait en outre un aspect beaucoup moins brillant que celle des feuilles des arbres en air filtré. Enfin, une défeuillaison prononcée a été observée pour les arbres traités, touchant les feuilles les plus âgées. La différence entre le nombre total de feuilles tombées pour les arbres traités et pour les arbres en air filtré apparaît lors des 10 derniers jours de traitement (figure 36).

II.2. Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène

La mise en évidence du peroxyde d'hydrogène a été réalisée sur des disques foliaires prélevés en fin de traitement sur des feuilles complètement développées. Les tissus foliaires prélevés ont été décolorés à l'éthanol puis infiltré en présence ou non de DAB, composé produisant une coloration brun rouge en présence de peroxyde d'hydrogène. La figure 37 montre quelques exemples représentatifs des résultats obtenus. Les clichés des tissus foliaires avant décoloration à l'éthanol permettent d'illustrer la chlorose plus ou moins prononcée des feuilles des arbres exposés à l'ozone et mettent en évidence les tâches nécrotiques sur leur face supérieure. En absence de DAB, ni les tissus décolorés des feuilles traitées ni ceux des feuilles témoins ne sont colorés. En présence de DAB, aucune coloration n'est observée sur les disques foliaires prélevés sur des arbres en air filtré. En revanche, les tissus foliaires provenant d'arbres traités montrent en présence de DAB une coloration brun-rouge en bordure des nécroses et le long des nervures. À 35 jours de fumigation, la quasi-totalité des feuilles pleinement développées exposées à l'ozone porte des nécroses, et ces nécroses sont systématiquement entourées de ce type de coloration. Par ailleurs, des zones colorées peuvent aussi être observées au niveau de zones non nécrosées.

Tableau 3 :
Effet de l'exposition à l'ozone sur les paramètres de croissance et d'accumulation de biomasse de la plante entière pendant les 35 jours de traitement.

L'effet de l'ozone est déterminé sur les paramètres mesurés après 35 jours de fumigation à 120 ppb pour les arbres traités et les arbres témoins (paramètres de croissance et nombre de feuilles, n = 28; paramètres de biomasse, RGR et SLA, n = 8). La significativité de l'effet du traitement est indiquée par la valeur *p* du test *t* de Student.

Paramètres après 35 jours	% de variation (ozone / air filtré)	Valeur de *p* (test *t*)
Croissance en hauteur (cm)	+ 1,5 %	0,644
Croissance radiale (mm)	- 13,3 %	0,006
Production totale de matière fraîche (g)	- 18,4 %	0,071
Production totale de matière sèche (g)	- 8,7 %	0,365
Humidité pondérale totale ($g_{H_2O}.g_{MS}^{-1}$)	- 11,8 %	0,035
RGR ($g.g^{-1}.j^{-1}$)	- 3,7 %	0,439
SLA ($cm^2.g_{MS}^{-1}$)	- 11,6 %	0,022
Nombre de feuilles tombées par arbre	+ 35,7 %	0,007
Nombre de feuilles formées par arbre	+ 7 %	0,171

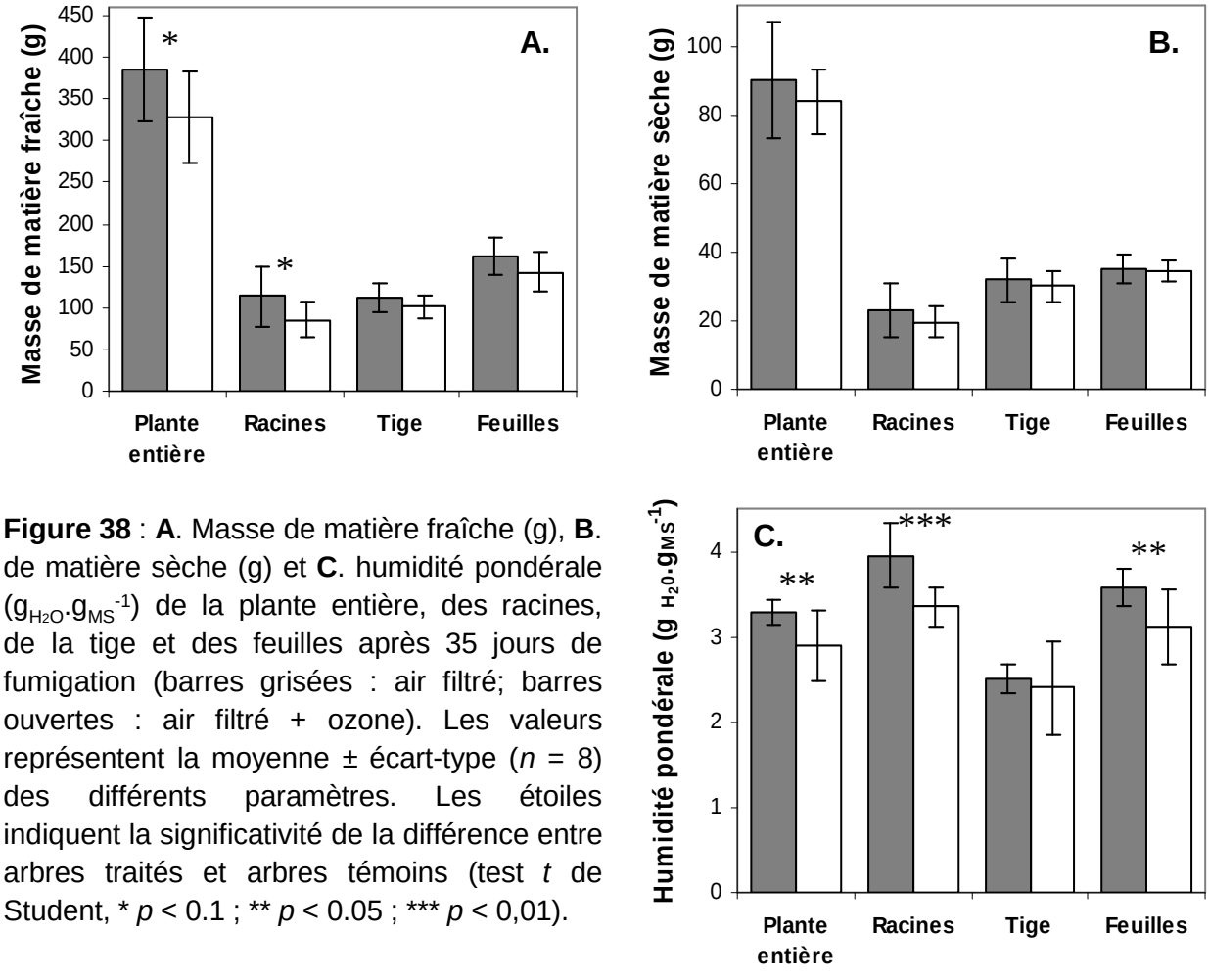


Figure 38 : **A**. Masse de matière fraîche (g), **B**. de matière sèche (g) et **C**. humidité pondérale ($g_{H_2O}.g_{MS}^{-1}$) de la plante entière, des racines, de la tige et des feuilles après 35 jours de fumigation (barres grisées : air filtré; barres ouvertes : air filtré + ozone). Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type (*n* = 8) des différents paramètres. Les étoiles indiquent la significativité de la différence entre arbres traités et arbres témoins (test *t* de Student, * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0,01$).

III. Croissance et biomasse

Le tableau 3 montre l'impact de l'ozone sur la croissance et l'accumulation de biomasse des arbres traités à l'issue de la période de 35 jours de fumigation. L'exposition à l'ozone n'a pas eu d'effet sur la croissance en hauteur mais a réduit de 13 % la croissance radiale des arbres traités (p = 0,006). Ceux-ci affichent une biomasse totale de matière fraîche 18 % inférieure à celle des arbres en air filtré (p < 0,1). Cette réduction de biomasse se répartit entre les racines (-25 % ; p < 0,1), la tige (-9 % ; n.s.) et les feuilles (-12 % ; n.s.) (figure 38). La biomasse de matière sèche est dans une moindre mesure affectée chez les arbres traités (-9 % pour la plante entière, -15 % pour les racines, -6 % pour la tige et -2 % pour les feuilles), mais cette tendance à la baisse n'est pas significative en termes statistique au seuil de risque α = 0,1. L'humidité pondérale des arbres exposés à l'ozone est en revanche inférieure de 12 % (p < 0,05) à celle des arbres témoins, avec en particulier une diminution de 15 % (p < 0,01) pour les racines, de 4 % (n.s.) pour la tige et de 13 % (p < 0,05) pour les feuilles. En comparaison aux réductions de croissance et de biomasse décrites, le taux de croissance relative (RGR), déterminé en fonction de la matière sèche, affiche une réduction limitée de 3,5 % (n.s.). Par ailleurs, les arbres exposés à l'ozone exhibent un taux d'abscission foliaire supérieur de 36 % (p < 0,05) à celui des arbres en air filtré et un taux de formation de nouvelles feuilles 7 % plus important (n.s.). Après 35 jours de traitement, les arbres traités affichent une surface foliaire spécifique plus faible que celle des arbres témoins (+12 % ; p < 0,05).

IV. Développement foliaire

IV.1. Détermination de la surface foliaire

Une relation log-linéaire a pu être établie entre la surface (SF, en dm²) et les dimensions (longueur L et largeur l, en cm) foliaires (figure 39). Le traitement n'affectant pas les relations obtenues (ANOVA univariée, α = 0,05), une analyse par régression linéaire a été réalisée en prenant en compte l'ensemble des points et a permis de déterminer les relations log-linéaires présentées sur la figure 39 (n = 97 ; p < 0,0001). L'intégration de la longueur et de la largeur en tant que variables permet d'améliorer le coefficient de régression et aboutit à la relation suivante :

$$\log(SF) = 1{,}068.\log(L) + 1{,}003.\log(l) + 1{,}733 \qquad R^2 = 0{,}996 \qquad (52)$$

L'application d'un modèle linéaire intégrant la surface foliaire en tant que variable dépendante et la longueur, la largeur et le traitement (ozone/air filtré) en tant que variables explicatives confirme

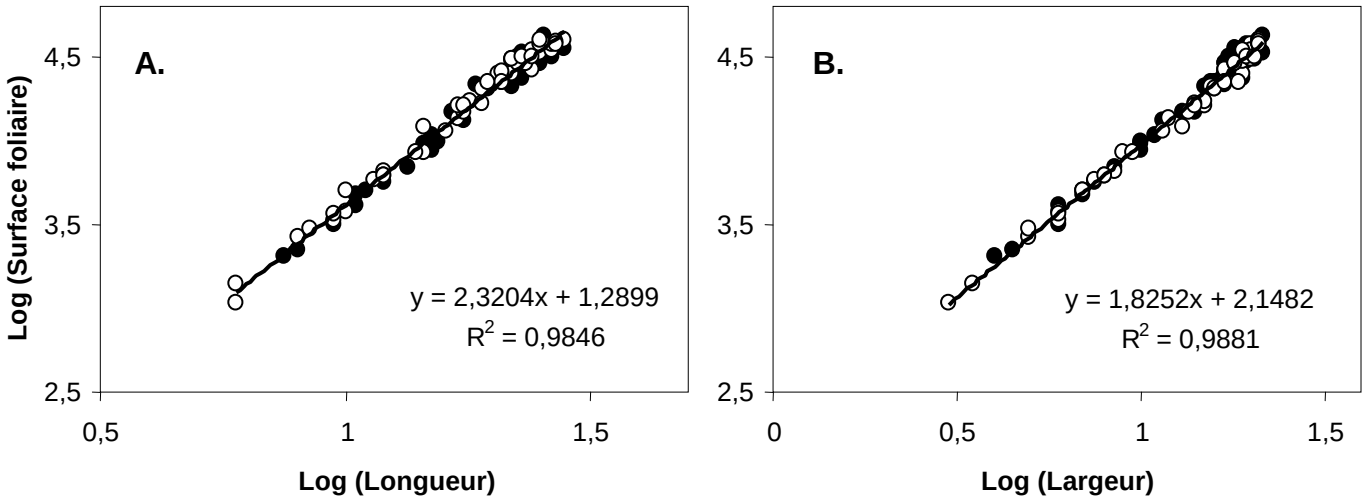


Figure 39 : Relation log-linéaire entre la surface foliaire (en mm²) et **A**. la longueur et **B**. la largeur (en cm) de feuilles d'arbres traités (symboles ouverts) et témoins (symboles pleins) à l'issue de la période de fumigation de 35 jours. Le traitement n'ayant pas d'effet sur la relation obtenue (ANOVA univariée, α = 0,05), la régression linéaire est établie à partir de l'ensemble des points et caractérisée par la droite, l'équation de droite et le coefficient de régression indiqués sur le graphe (n = 97 ; p < 0.0001).

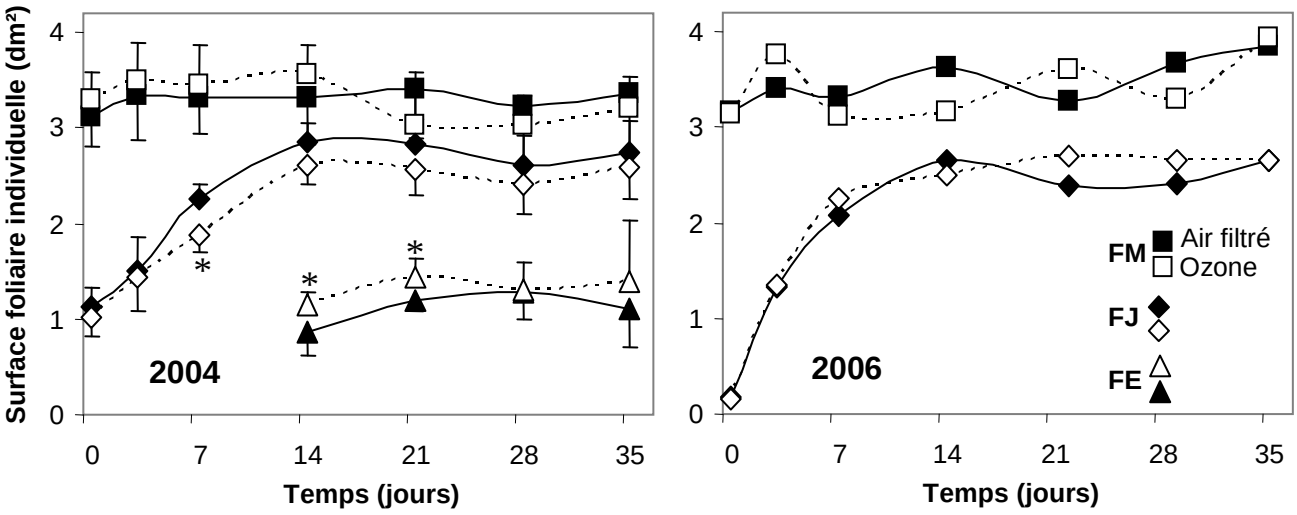


Figure 40 : Évolution de la surface foliaire individuelle moyenne au cours des 35 jours de traitement de 2004 et 2006 pour les feuilles matures (FM, carrés), jeunes (FJ, losanges) et en expansion (FE, triangles) (symboles pleins : air filtré; symboles ouverts : air filtré + ozone). Pour 2004, les valeurs représentent la moyenne ± écart-type (n = 8) et les étoiles indiquent la significativité de la différence entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student, p < 0.05). Pour 2006, seules les moyennes sont présentées (n = 4).

l'absence d'effet de l'exposition à l'ozone sur la relation linéaire établie (p = 0,778), ce qui permet de valider son utilisation pour déterminer la surface d'une feuille à partir de la mesure de ses dimensions pour les arbres traités comme pour les arbres en air filtré. De plus, le fait que la relation linéaire soit conservée sur l'ensemble de la gamme de taille des feuilles étudiées permet d'appliquer cette relation quelque soit le stade de développement foliaire considéré.

IV.2. Évolution de la surface foliaire

La mesure systématique des dimensions des feuilles prélevées au cours des expériences de 2004 et de 2006 a permis de suivre l'évolution de la surface des feuilles des trois étages foliaires étudiés (figure 40). L'échantillonnage plus réduit en 2006 limite la portée des informations statistiques apportées par cette deuxième série de données. En conséquence, la description des données de 2004 sera privilégiée. La surface des feuilles matures (FM), complètement développées avant le début de la période de fumigation, se maintient entre 3 et 3,5 dm² et n'est pas affectée par l'exposition à l'ozone. La surface des feuilles jeunes (FJ), se développant au cours de la période de traitement, passe de 1 à 2,5 dm² lors des deux premières semaines puis plafonne à cette valeur maximale. L'exposition à l'ozone tend à ralentir le développement des FJ (-17 % à 7 jours, p < 0,05). Néanmoins, la pente déterminée sur la partie linéaire d'expansion des feuilles des arbres traités n'est pas statistiquement différente de celle des feuilles des arbres en air filtré (ANCOVA, α = 0,05). Les feuilles en expansion (FE), prises en compte à partir du 14ème jour de traitement et dont le stade de développement est comparable à celui des FJ à temps 0, affichent une surface foliaire stable d'environ 1 dm², équivalente à celle de ces dernières. La surface des FE des arbres traités tend à être supérieure à celle des FE des arbres témoins (+30 % à 14 jours et +20 % à 21 jours, p < 0,05). La série de données de 2006 permet de valider un certain nombre d'observations : surface maximale d'environ 3,5 dm² pour les FM et 2,5 dm² pour les FJ, expansion maximale des FJ atteinte à partir de 14 jours de traitement. L'exposition à l'ozone ne semble pas avoir eu d'effet sur la surface foliaire des FM ni des FJ, ce qui est confirmé par des tests statistiques non paramétriques, mais le faible nombre de répétitions (n = 4) limite la valeur de ces conclusions.

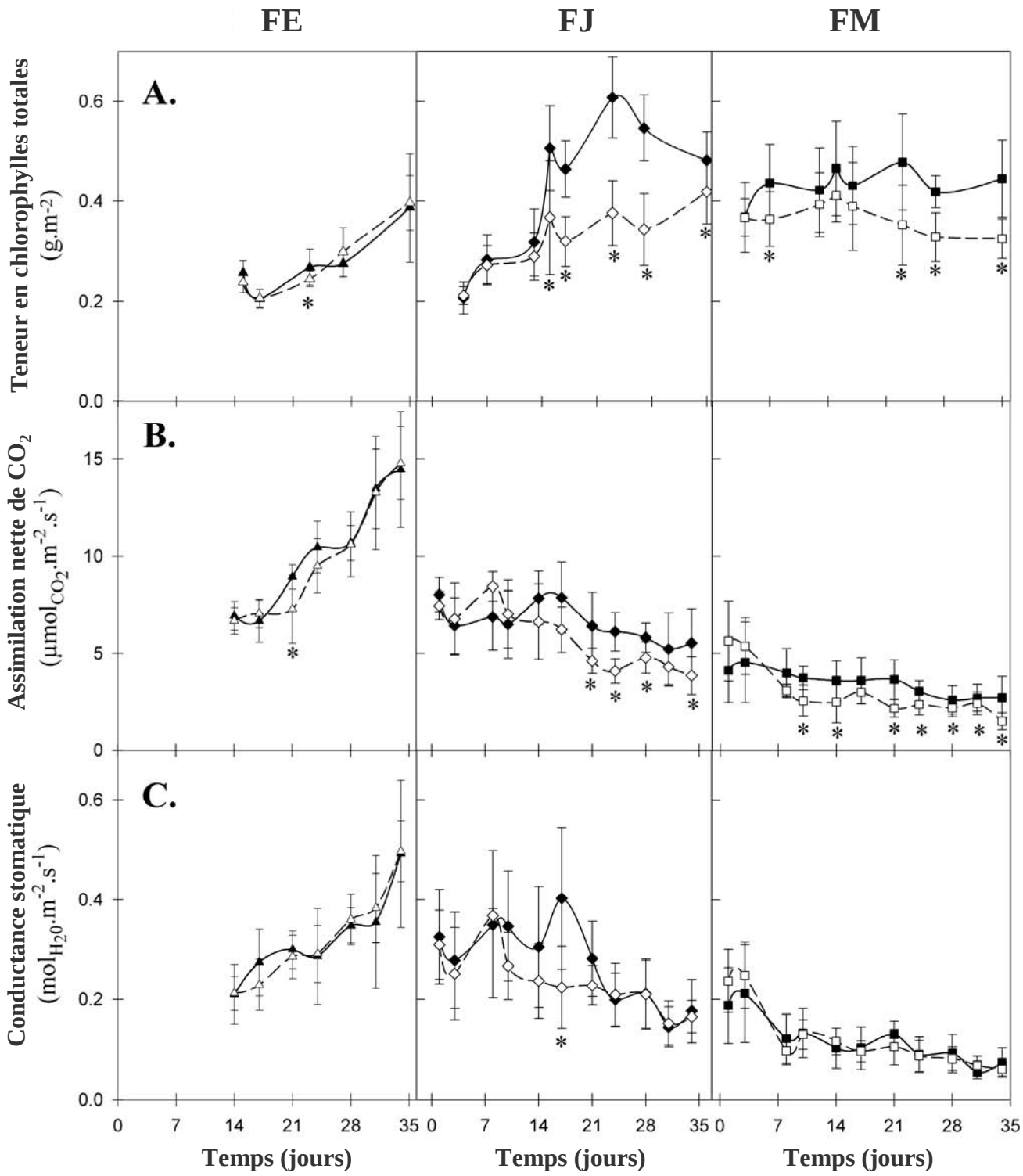


Figure 41 : Évolution de **A.** la teneur en chlorophylles totales (Chl), **B.** l'assimilation nette de CO_2 (*A*) et **C.** la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) des feuilles à trois stades de développement, feuilles en expansion (FE, triangles), feuilles jeunes (FJ, losanges) et feuilles matures (FM, carrés) au cours des 35 jours de traitement (en air filtré : symboles pleins et lignes continues, ozone : symboles ouverts et lignes pointillées). Les mesures ont été réalisés *in situ* dans les conditions de culture. Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres étudiés (Chl n = 16, A et g_s n = 8). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student, $p < .05$).

V. Paramètres photosynthétiques

V.1. Teneurs en chlorophylles totales

La figure 41.A montre l'évolution au cours de la période de fumigation de la teneur en chlorophylles totales dans les trois groupes de feuilles étudiés. Pour les FM, la teneur en chlorophylles totales ne varie pas avec le temps (ANOVA, α = 0,05), se maintenant autour de 0,4 $g.m^{-2}$, mais est réduite dans les FM des arbres exposés à l'ozone à 0,3 $g.m^{-2}$. Cette réduction apparaît dès 7 jours (-16 % ; $p < 0,05$) et est plus marquée en fin de traitement (-26 % à 23 jours, -21 % à 27 jours et -27 % à 35 jours ; $p < 0,05$). Pour les FJ en air filtré, la teneur en chlorophylles augmente de 0,2 à presque 0,6 $g.m^{-2}$ de 4 à 23 jours, avant de décliner ensuite jusqu'à 0,45 $g.m^{-2}$ à 35 jours. La teneur en chlorophylles des FJ exposées à l'ozone augmente de manière similaire pendant les deux premières semaines mais affiche lors des deux semaines suivantes un niveau bien inférieur à celui des FJ témoins (-38 % à 23 jours ; $p < 0,05$). Enfin, la teneur en chlorophylles totales des FE passe de 0,2 à 0,4 $g.m^{-2}$ de 14 à 35 jours de traitement et n'est pas affectée par l'exposition à l'ozone, à l'exception d'une légère diminution de 8 % à 21 jours ($p < 0,05$).

V.2. Assimilation nette de CO_2 et conductance stomatique

Les deux volets inférieurs de la figure 41 décrivent l'évolution au cours de la période de fumigation de l'assimilation nette de CO_2 (A) et de la conductance stomatique (g_s) pour les trois étages foliaires considérés. Pour les FM des arbres en air filtré, ces deux paramètres déclinent graduellement au cours des 35 jours d'expérience (ANOVA, $p < 0,05$). A et g_s passent ainsi de 5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et 200 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ en début d'expérience à respectivement 2,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et 75 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ après 35 jours. À partir de la deuxième semaine de traitement, l'exposition à l'ozone réduit l'assimilation de 20 à 40 % ($p < 0,05$) sans que la conductance stomatique ne soit modifiée. Les FM traitées affichent en fin de traitement une assimilation très faible d'à peine 1,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Pour les FJ témoins, A et g_s tendent à augmenter pendant les trois premières semaines d'expérience, mais cette tendance ne se révèle pas significative (ANOVA, α = 0,05). A et g_s atteignent à 17 jours une valeur maximale de 7,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et 0,4 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ respectivement. À partir de ce point, les deux paramètres diminuent avec le temps et affichent une valeur de 5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et 180 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ en fin d'expérience. L'exposition à l'ozone réduit l'assimilation nette des FJ traitées à partir de la deuxième semaine de traitement et cette réduction devient significative à partir de 21 jours (-20 à -35 % ; $p < 0,05$). La conductance stomatique des FJ des arbres exposés à l'ozone exhibe une diminution de 10 à 21 jours de traitement par rapport aux FJ des arbres en air filtré, particulièrement marquée à 17 jours (-44 %

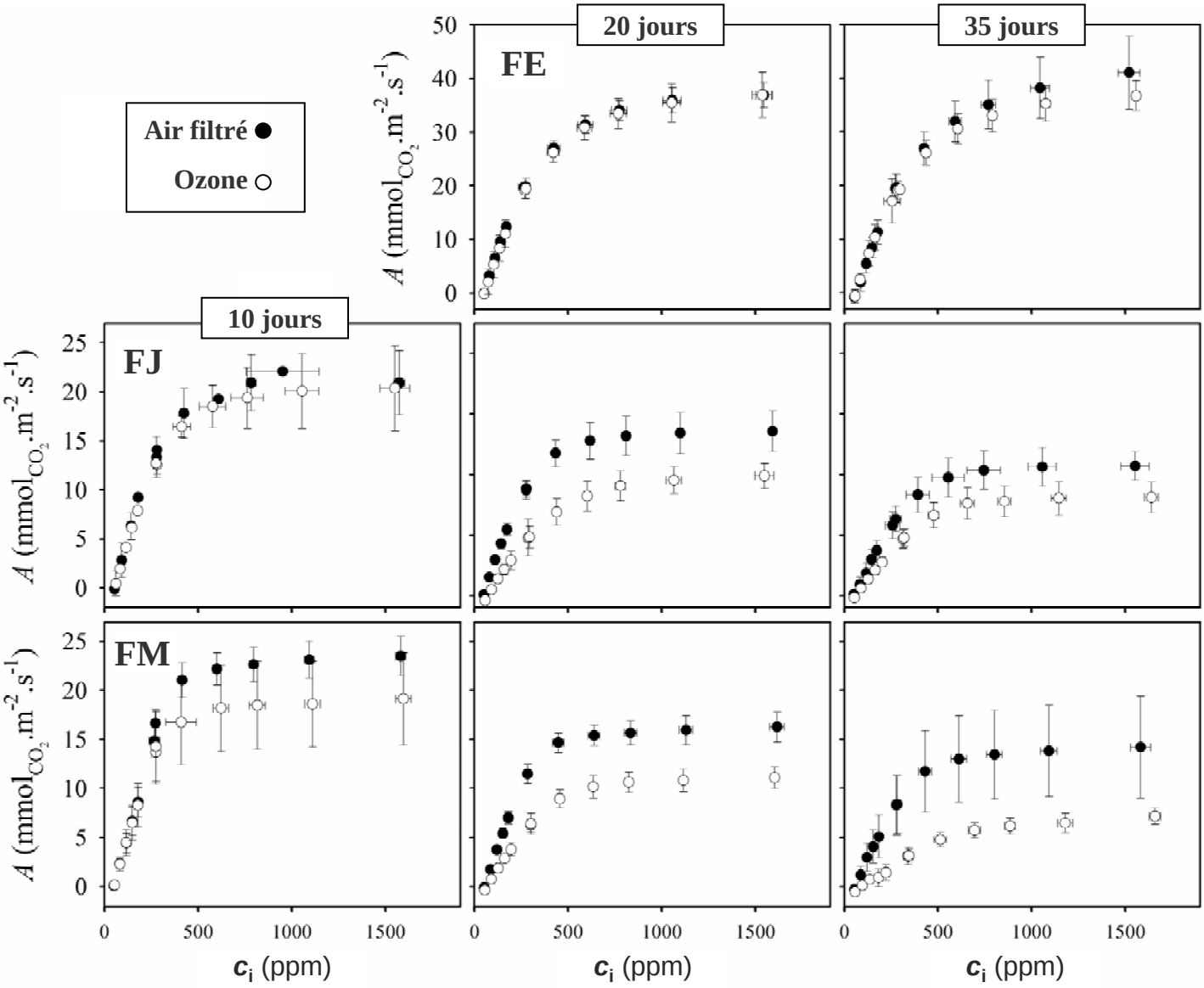


Figure 42 : Réponse de l'assimilation nette de CO_2 (A) à la variation de la concentration intercellulaire en CO_2 (c_i) pour des feuilles à trois stades de développement (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) à 10, 20 et 35 jours de traitement (air filtré : symboles pleins, ozone : symboles ouverts). Les mesures ont été réalisés *in vivo* au laboratoire en conditions lumineuses saturantes (PPFD de 1000 µmol.m^{-2}.s^{-1}). Pour chaque traitement et étage foliaire, les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des couples A/c_i (10 et 20 jours n = 3 ; 35 jours n = 4).

$p < 0,05$). Pour les FE, A et g_s augmentent nettement entre 14 et 35 jours d'expérience : A passe ainsi de 6 à 13 µmol.m^{-2}.s^{-1} et g_s de 200 à 450 mmol.m^{-2}.s^{-1}. L'exposition à l'ozone n'a pas d'effet sur les échanges gazeux des FE, à l'exception d'une réduction ponctuelle de 18 % de A à 21 jours ($p < 0,05$).

V.3. Courbes A/C$_i$ et paramètres photosynthétiques dérivés

La réponse de l'assimilation nette de CO_2 (A) à la variation de la concentration intracellulaire en CO_2 (C_i) des trois types de feuilles au cours de la période de fumigation est présentée dans la figure 42. Les FM et les FJ montrent une diminution graduelle avec le temps de la pente initiale et du niveau du plateau de la courbe A/C_i. À 10 jours, l'exposition à l'ozone n'affecte pas la réponse photosynthétique des FJ mais réduit le niveau du plateau des FM des arbres traités. À 20 et 35 jours de traitement, la pente initiale et le niveau du plateau de la courbe A/C_i sont conjointement réduits chez les arbres traités, à la fois pour les FM et les FJ. La réponse photosynthétique des FE à 20 et 35 jours de traitement n'est quant à elle pas affectée par l'exposition à l'ozone.

L'analyse des courbes A/C_i individuelles permet de décrire un certain nombre de paramètres physiologique des feuilles étudiées (V_{cmax}, J_{max}, TPU, R_d). La méthode suivie pour établir les courbes A/C_i ne permettant pas de placer la photosynthèse en conditions de limitation par l'utilisation des trioses-phosphate, le paramètre TPU n'est pas décrit ici. La respiration mitochondriale de jour (R_d) sera quant à elle abordée dans une section suivante. On s'intéresse donc ici aux paramètres photosynthétiques V_{cmax} (vitesse maximale de carboxylation du RuBP par la rubisco) et J_{max} (densité maximale du flux d'électrons photosynthétiques) dont les valeurs sont présentées dans la figure 45. Dans les FM des arbres en air filtré, ces deux paramètres déclinent avec le temps, V_{cmax} passant de 65 à 45 µmol.m^{-2}.s^{-1} et J_{max} de 110 à 65 µmol.m^{-2}.s^{-1} entre 10 et 35 jours d'expérience. Dans les FJ témoins, V_{cmax} et J_{max} évoluent respectivement de 70 à 90 µmol.m^{-2}.s^{-1} et de 100 à 125 µmol.m^{-2}.s^{-1} de 10 à 20 jours, avant de diminuer jusqu'à respectivement 70 et 105 µmol.m^{-2}.s^{-1} à 35 jours. Les deux paramètres ne sont pas significativement affectés pour les FM et les FJ à 10 jours de traitement. À 20 et 35 jours de traitement, l'exposition à l'ozone réduit nettement V_{cmax} et J_{max}. Les FM des arbres traités affichent une réduction de 45 % de V_{cmax} ($p < 0,05$) et 35 % de J_{max} ($p < 0,075$). Pour les FJ, le niveau de réduction atteint pour V_{cmax} -45 % ($p < 0,05$) et pour J_{max} -30 % ($p < 0,05$). Pour les FE enfin, les valeurs de V_{cmax} et J_{max}, relativement élevées pour les deux paramètres (entre 100 et 120 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour V_{cmax} et entre 160 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour J_{max}), montrent une légère augmentation entre 20 et 35 jours mais ne sont pas modifiées significativement par l'exposition à l'ozone.

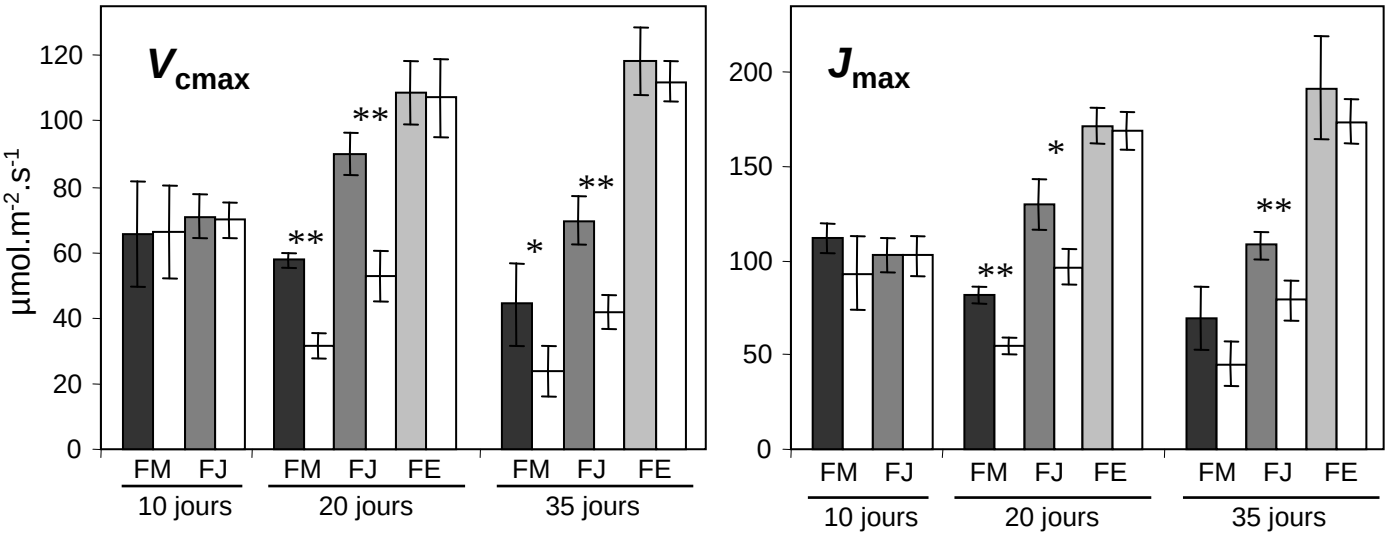


Figure 43 : Vitesse maximale de carboxylation du RuBP par la rubisco (V_{cmax}) et densité maximale du flux d'électrons photosynthétiques (J_{max}) de feuilles à trois stades de développement (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) à 10, 20 et 35 jours de traitement (air filtré : barres grisées, ozone : barres ouvertes). Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres considérés (10 et 20 jours n = 3 ; 35 jours n = 4). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; p < 0,05).

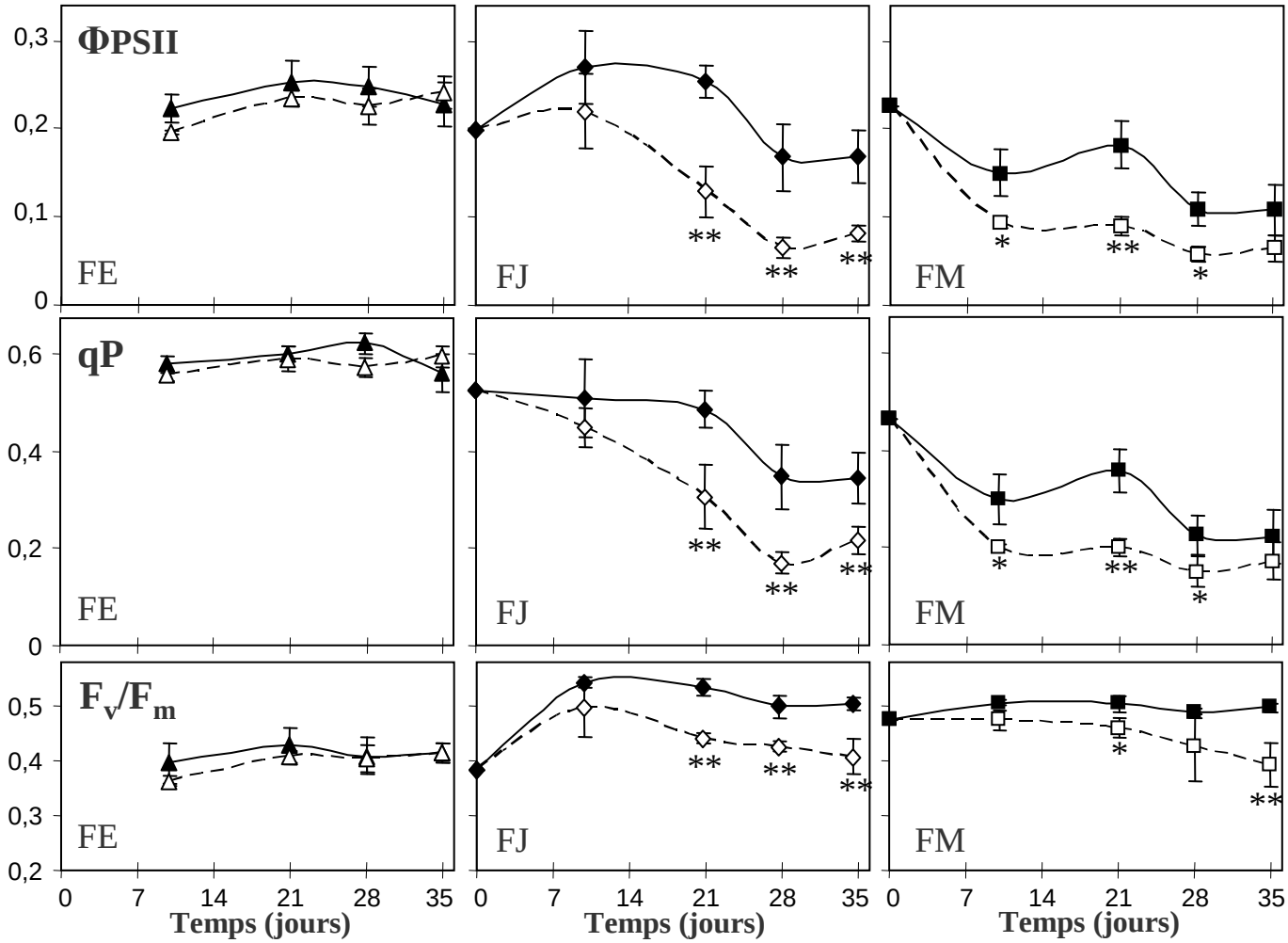


Figure 44 : Évolution des paramètres dérivés des mesures de fluorescence chlorophyllienne (rendement quantique du PSII Φ_{PSII}, *quenching* photochimique qP et rapport F_v/F_m) de feuilles à trois stades de développement (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) à 0, 10, 21, 28 et 35 jours de traitement (air filtré : symboles pleins et lignes continues ; ozone : symboles ouverts et lignes pointillées). Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres considérés (n = 4). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; p < 0,05).

V.4. Paramètres dérivés de la fluorescence chlorophyllienne

L'évolution au cours de la période de traitement des paramètres dérivés des mesures de fluorescence chlorophyllienne est présentée dans la figure 44. Pour les FM des arbres en air filtré, le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et l'indice de *quenching* photochimique (qP) diminuent de moitié entre 0 et 35 jours d'expérience tandis que le rapport F_v/F_m se maintient à une valeur proche de 0,5. Pour les FJ témoins, Φ_{PSII} et F_v/F_m augmentent entre 0 et 10 jours d'expérience, Φ_{PSII} passant de 0,2 à 0,27, tandis que qP reste stable autour de 0,5. À partir de 21 jours, Φ_{PSII} et qP affichent une diminution coordonnée avec le temps, le rapport F_v/F_m se maintenant à un niveau stable. Pour les FE témoins, ces trois paramètres n'évoluent pas avec le temps. Dans les FM des arbres traités, Φ_{PSII} et qP sont réduits significativement dès 10 jours de traitement. Cette réduction est maximale à 21 jours (-50 % pour Φ_{PSII} et -45 % pour qP ; $p < 0.01$) et faiblit en fin de traitement. Le rapport F_v/F_m est affecté plus tardivement mais affiche tout de même à 35 jours une valeur 20 % inférieure à celle des FM témoins ($p < 0.01$). Pour les FJ des arbres traités, l'exposition à l'ozone ne réduit significativement les trois paramètres qu'à partir de 21 jours de traitement, avec en moyenne -50 % pour Φ_{PSII}, -40 % pour qP et -15 % pour F_v/F_m ($p < 0,01$). Enfin, aucune modification significative n'est notée pour les FE des arbres traités à l'ozone.

V.5. Activité enzymatique des carboxylases rubisco et PEPc

La figure 45 montre l'évolution de l'activité carboxylase spécifique de la rubisco et de la PEPc au cours de la période de traitement. Dans les FM des arbres en air filtré, l'activité des deux carboxylases ne varie pas significativement avec le temps malgré une tendance globale à la baisse pour l'activité rubisco et à la hausse pour l'activité PEPc. Dans les FJ témoins, l'activité rubisco augmente fortement entre 0 et 21 jours, progressant de 2 à 13 $nkat.mg_{prot}^{-1}$, puis décroît ensuite, tandis que l'activité PEPc augmente sensiblement à partir de 14 jours de traitement, passant de 0,5 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ à 14 jours à 1 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ en fin d'expérience. À 21 jours de fumigation, l'activité rubisco affiche une réduction marquée en réponse à l'ozone (-50 % pour les FM et -40 % pour les FJ ; $p < 0,05$) alors que l'activité PEPc est stimulée deux fois pour les FM traitées et trois fois pour les FJ ($p < 0,05$). Pour les FE, l'activité des deux carboxylases tend à progresser avec le temps mais n'est pas significativement affectée par l'exposition à l'ozone, à l'exception d'un léger effet à 14 jours (+20 % pour la rubisco et -15% pour la PEPc ; $p < 0,05$). On peut aussi noter que l'activité rubisco des FE des arbres traités est toujours supérieure à celle mesurée dans les FE des arbres en air filtré, mais cette tendance ne se révèle pas significative.

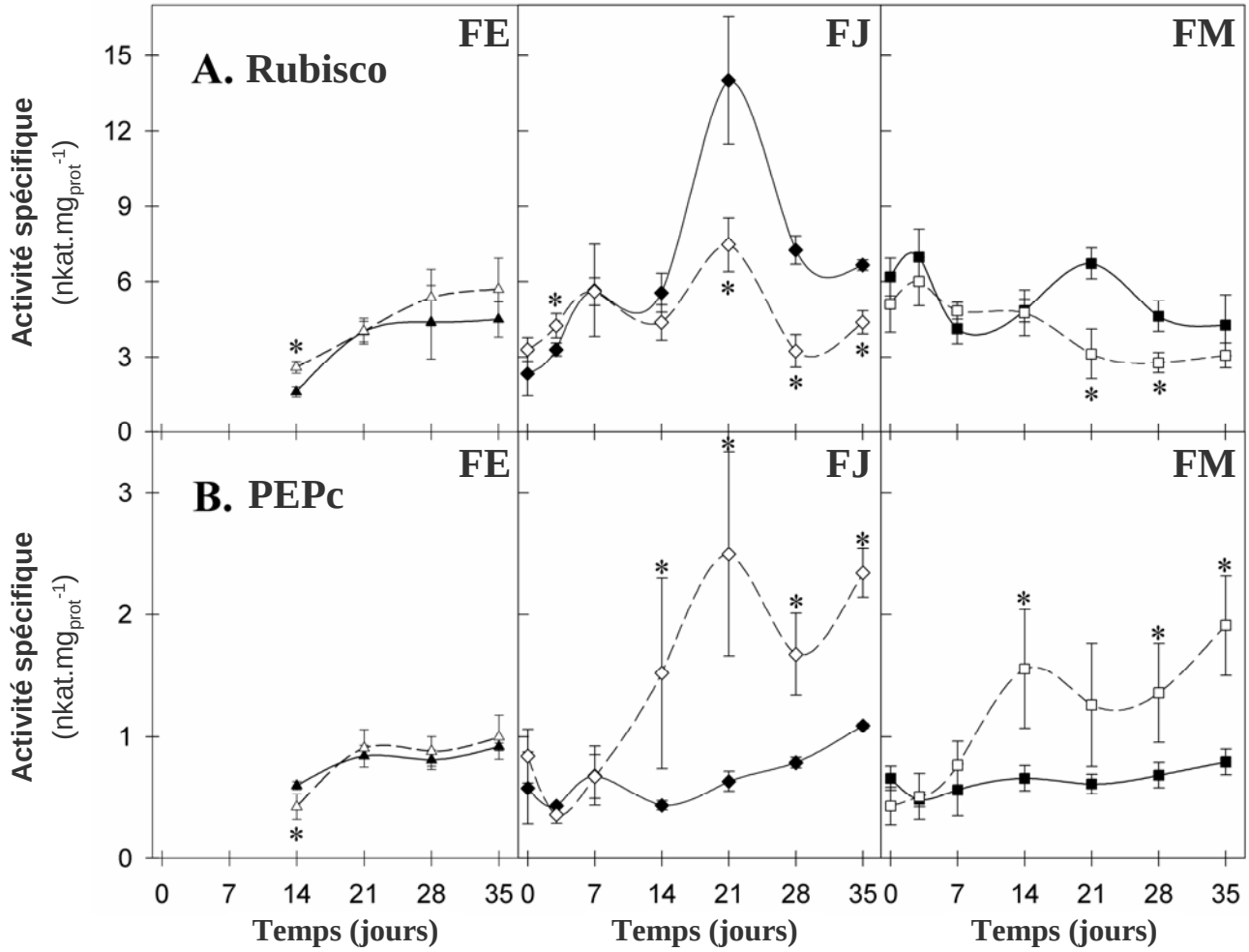


Figure 45 : Évolution de l'activité spécifique de la rubisco (activité carboxylase totale, **A**.) et de la PEPc (**B**.) des feuilles à trois stades de développement (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ, et feuilles matures FM) au cours des 35 jours de traitement (arbres en air filtré : symboles pleins et lignes continues, ozone : symboles ouverts et lignes pointillées). Les valeurs sont exprimées en terme d'activité spécifique (nkat.mg$_{prot}^{-1}$) et représentent la moyenne ± écart-type des paramètres étudiés (air filtré n = 4, ozone n = 6). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student, p < .05).

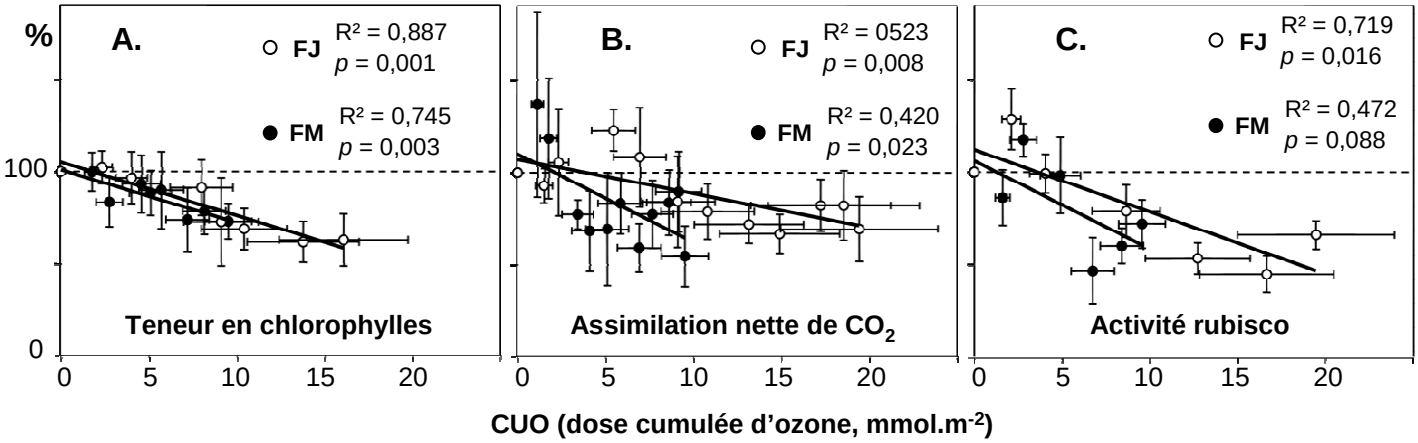


Figure 46 : Réponse de la teneur en chlorophylles totales (**A**.), de l'assimilation nette de CO_2 (**B**.) et de l'activité carboxylase de la rubisco (**C**.) à la dose cumulée d'ozone (CUO) pour les feuilles jeunes (FJ, symboles ouverts) et les feuilles matures (FM, symboles pleins). En abscisse : moyenne ± écart-type du CUO (n = 8). En ordonnée : moyenne ± écart-type des valeurs relatives des trois paramètres par rapport à la moyenne des témoins (Chl, n = 16 ; A, n = 8 ; rubisco, n = 4-6). Les droites ont été tracées à partir d'une analyse par régression linéaire de chaque série de données. Le coefficient de corrélation R^2 et la probabilité associée à la relation sont données sur les graphes (ANOVA).

V.6. Réponse des paramètres photosynthétiques au CUO

La réponse à l'ozone de la teneur en chlorophylles totales, de l'assimilation nette de CO_2 et de l'activité carboxylase totale de la rubisco a été analysée en fonction de la dose cumulée associée au flux stomatique d'ozone (CUO). La figure 46 présente les relations linéaires entre les valeurs relatives de ces trois paramètres (exprimées en pourcentage de la valeur moyenne du contrôle) et le CUO, et ce, pour les étages foliaires FJ et FM. Cinq des six relations linéaires obtenues sont significatives au seuil de risque α = 0,05. La relation linéaire entre l'activité rubisco relative des FM et le CUO est, elle, moins nette (p = 0,088). Les trois paramètres photosynthétiques considérés sont négativement corrélés au CUO pour les deux étages foliaires. Cette corrélation négative est équivalente pour les FM et les FJ au regard de la teneur en chlorophylles, mais diffère d'un étage foliaire à l'autre pour l'assimilation et l'activité rubisco. Pour ces deux paramètres, la valeur absolue du coefficient directeur de la droite de régression linéaire des FJ est plus faible que celle de la droite associée aux FM, mais cette différence ne se révèle significative que pour les valeurs d'assimilation (test t de comparaison de pentes, $p < 0,05$).

VI. Respiration mitochondriale

Deux paramètres rendant compte de la respiration associée aux phosphorylations oxydatives mitochondriales ont été considérés. Il s'agit d'une part de R_d, respiration mitochondriale dite « de jour » (mais qui exclue la photorespiration) déterminée à partir des courbes A/C_i, et d'autre part de R_n, respiration dite « de nuit » qui correspond au dégagement de CO_2 mesuré *in vivo* à l'obscurité. Les valeurs de ces deux paramètres à 10, 20 et 35 jours de traitement sont présentées dans la figure 47. Pour les FM des arbres en air filtré, R_d et R_n varient peu avec le temps, se maintenant autour de 1 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. L'exposition à l'ozone ne modifie pas R_d mais stimule nettement R_n à 20 et 35 jours de fumigation (+85 % à 21 jours ; $p < 0,05$). Pour les FJ des arbres témoins, R_d et R_n tendent à diminuer avec le temps, passant respectivement de 1,5 à 1 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et de 2 à 1,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ entre 10 et 35 jours de traitement. Les deux paramètres montrent une tendance globale à la hausse en réponse à l'ozone. Cette stimulation est particulièrement marquée à 20 jours où R_d et R_n sont stimulées presque deux fois par rapport aux FJ des arbres en air filtré ($p < 0,05$). Les FE exhibent des valeurs relativement hautes de R_d (3 à 4 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) et de R_n (4,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) et l'exposition à l'ozone n'a pas d'effet significatif.

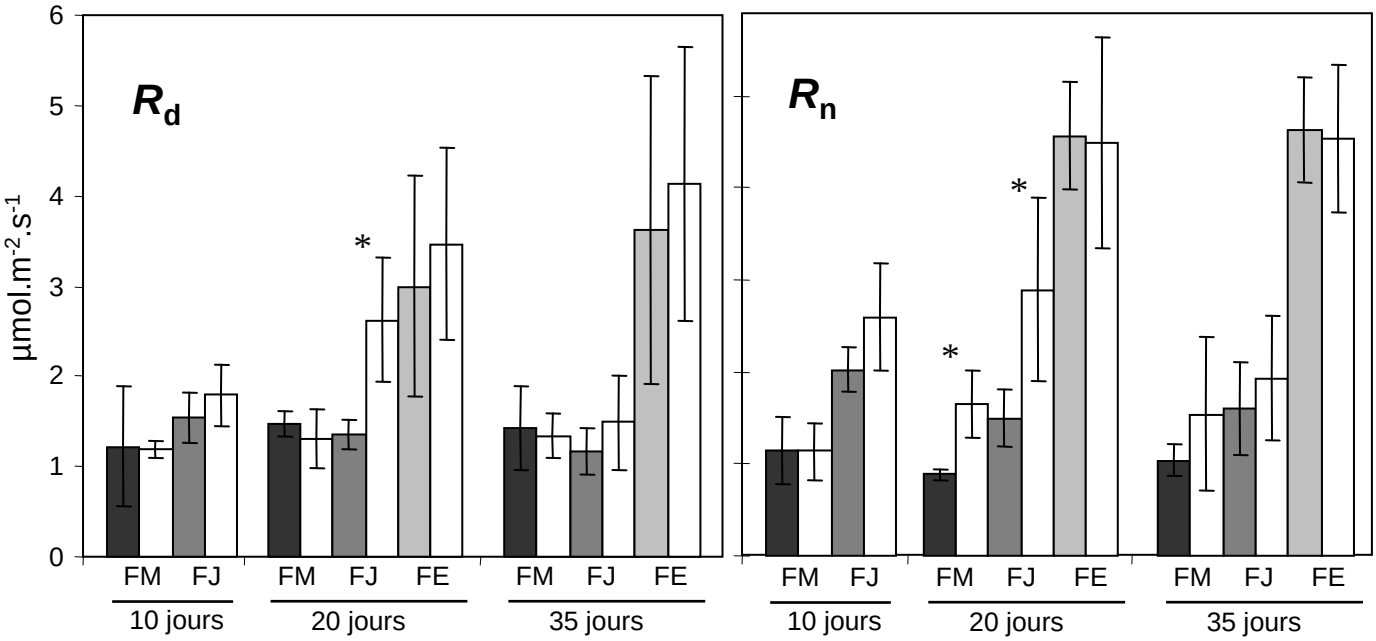


Figure 47 : Respiration mitochondriale de jour (R_d) et de nuit (R_n) des feuilles à trois stades de développement (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) à 10, 20 et 35 jours de traitement (air filtré : barres grisées, ozone : barres ouvertes). R_d est dérivée de l'ajustement des courbes A/Ci tandis que R_n est mesurée *in vivo* à l'obscurité. Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres considérés (10 et 20 jours n = 3 ; 35 jours n = 4). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; $p < 0,05$).

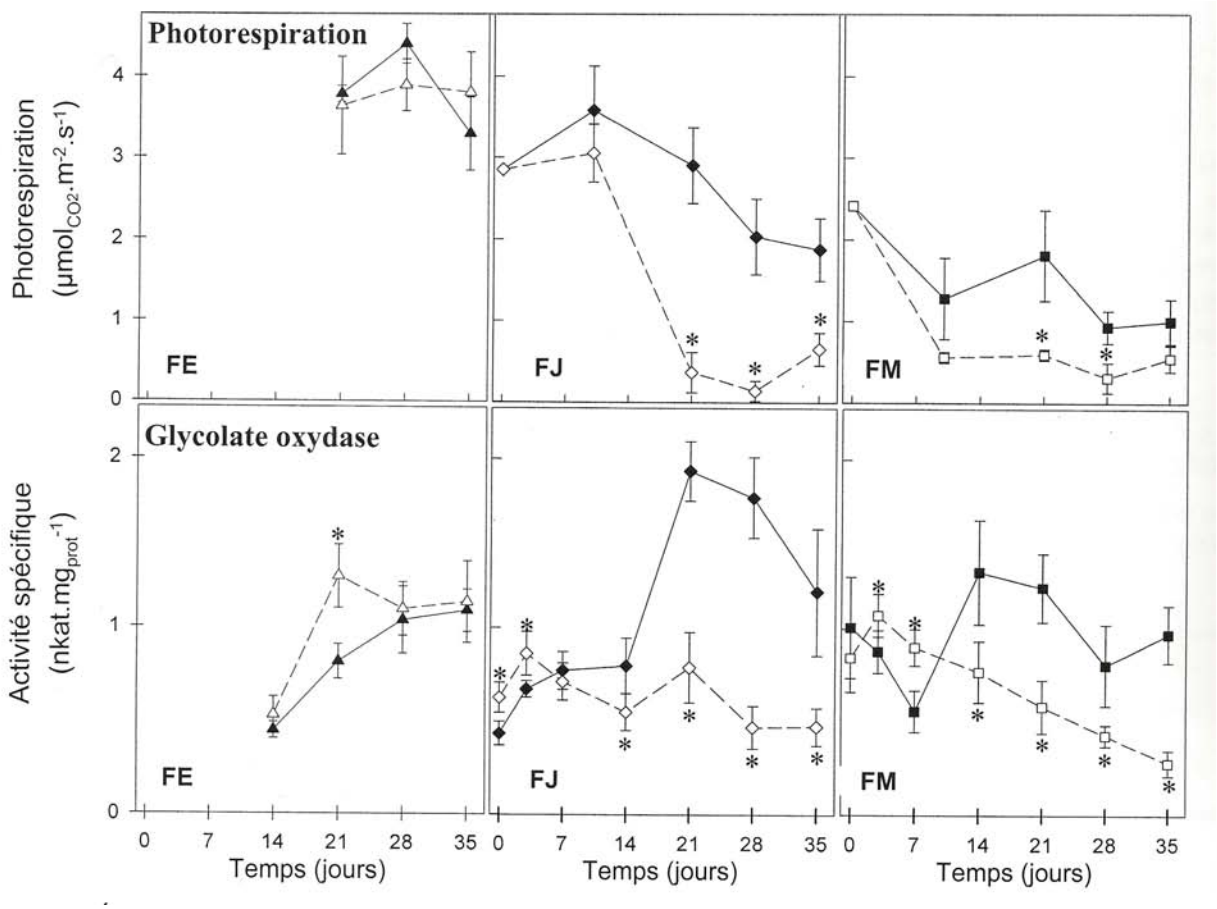


Figure 48 : Évolution au cours de la période de fumigation du taux de photorespiration *in vivo* (P_r) et de l'activité spécifique de la glycolate oxydase (GO) pour trois étages foliaires (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) d'arbres en air filtré (symboles pleins et lignes continues) ou exposés à l'ozone (symboles ouverts et lignes pointillées). Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres considérés (P_r n = 4 ; GO n = 4-6). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; $p < 0,05$).

VI. Photorespiration

VI.1. Activité photorespiratoire in vivo

L'évolution au cours de la période de fumigation du taux de photorespiration (P_r) est décrite dans la figure 48.A. Ce taux correspond au dégagement de CO_2 associé à l'activité photorespiratoire, déterminé à partir des mesures *in vivo* des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne. Dans les FM des arbres en air filtré, le taux de photorespiration tend globalement à diminuer avec le temps, régressant de 2,5 à 1 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ entre 0 et 35 jours d'expérience. L'activité photorespiratoire des FJ témoins se maintient autour de 3 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de 0 à 10 jours avant de décroître jusqu'à une valeur 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ en fin d'expérience. L'exposition à l'ozone réduit nettement l'activité photorespiratoire de ces deux étages foliaires. Pour les FM traitées, cette réduction intervient dès 10 jours de fumigation et est maximale à 21 jours (-50 % ; $p < 0,05$). Le taux de photorespiration est plus fortement touché par l'ozone dans les FJ, qui affichent une réduction de près de 90 % à 21 et 28 jours ($p < 0,05$). Lors des deux dernières semaines de traitement, l'activité photorespiratoire des FM et des FJ atteint un niveau inférieur à 1 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Dans les FE, cette activité fluctue autour de 4 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et ne varie de façon significative ni avec le temps ni en réponse à l'ozone.

VI.2. Activités enzymatiques photorespiratoires

VI.2.1. Glycolate oxydase

L'évolution de l'activité glycolate oxydase (GO) au cours de la période de fumigation dans les trois étages foliaires est présentée dans la partie inférieure de la figure 48.B. Dans les FM et les FJ des arbres en air filtré, l'activité GO, inférieure à 1 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ pendant les deux premières semaines, augmente ensuite jusqu'à 1,2 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ à 14 jours pour les FM et 2 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ à 21 jours pour les FJ., pour ensuite décroître jusqu'à 35 jours. En réponse à l'ozone, l'activité GO montre pour ces deux étages foliaires une légère stimulation en début de fumigation ($p < 0,05$) puis une forte réduction à partir de 14 jours de traitement, réduction allant jusqu'à 75 % pour les deux étages foliaires ($p < 0,05$). Pour les FE, l'activité GO progresse avec le temps de 0,5 à 1 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ dans les témoins et n'est pas modifiée par l'exposition à l'ozone, sauf à 21 jours où l'activité GO mesurée dans les FE des arbres traités est 40 % supérieure à celle des témoins ($p < 0,05$).

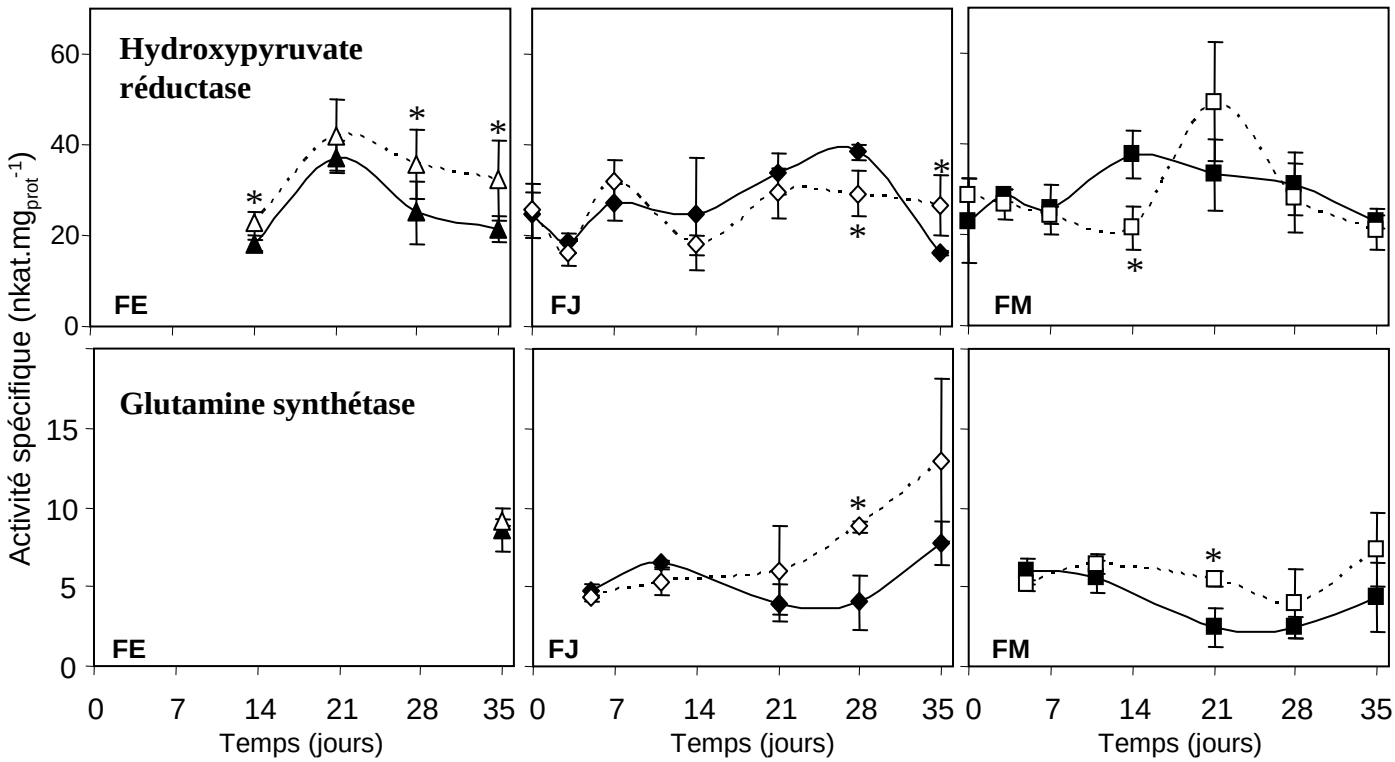


Figure 49 : Évolution au cours de la période de fumigation de l'activité spécifique de l'hydroxypyruvate réductase (HPR) et de la glutamine synthétase (GS) pour trois étages foliaires (feuilles en expansion FE, feuilles jeunes FJ et feuilles matures FM) d'arbres en air filtré (symboles pleins et lignes continues) ou exposés à l'ozone (symboles ouverts et lignes pointillées). Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des paramètres considérés (HPR n = 4-6 ; GS n = 3-6). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; $p < 0,05$).

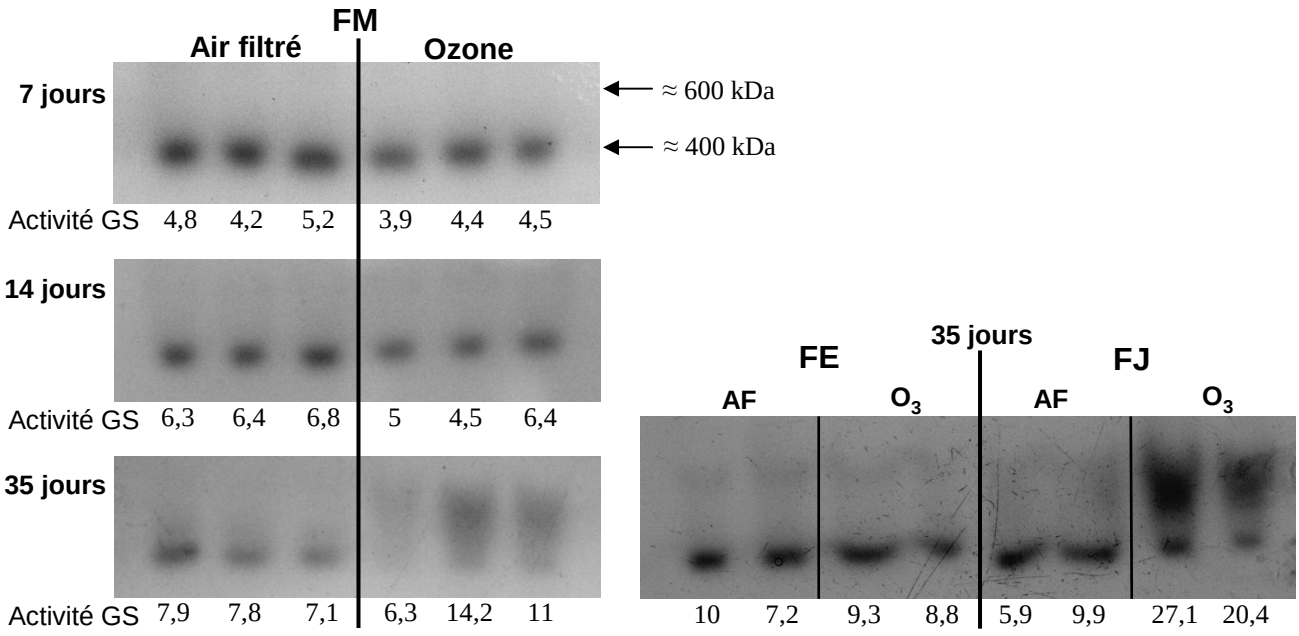


Figure 50 : Révélation sur gel de l'activité glutamine synthétase (GS) après électrophorèse en conditions natives d'extraits foliaires de protéines solubles totales. Les extraits sont issus de feuilles prélevées à 7, 14 et 35 jours de traitement pour les FM (feuilles matures), et à 35 jours pour les FE (feuilles en expansion) et les FJ (feuilles jeunes). L'activité spécifique GS totale (en nkat.mg$_{prot}^{-1}$) mesurée dans les extraits déposés est indiquée sous les pistes correspondantes. Les bandes de coloration observées sont associées à un poids moléculaire approximatif de 400 kDa pour la plus basse et de 600 kDa pour la plus haute. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes, réalisées à partir d'extraits foliaires distincts.

VI.2.2. Hydroxypyruvate réductase

L'activité spécifique de l'hydroxypyruvate réductase (HPR), présentée dans le volet supérieur de la figure 49, tend à augmenter avec le temps jusqu'à 14 jours dans les FM témoins et 28 jours dans les FJ témoins, avant de diminuer jusqu'à 35 jours pour les FM comme pour les FJ. Pour ces deux étages foliaires, l'exposition à l'ozone n'affecte que de manière ponctuelle l'activité HPR, qui montre de plus des fluctuations importantes. Les valeurs d'activité HPR mesurée dans les FE, comparables à celles des FM et des FJ, sont comprises entre 20 et 40 $nkat.mg_{prot}^{-1}$ et sont à chaque temps supérieures dans les FE traitées.

VI.3. Glutamine synthétase (GS)

VI.3.1. Activité spécifique de la GS

Le volet inférieur de la figure 49 montre l'évolution de l'activité spécifique totale de la glutamine synthétase (GS) dans les trois types de feuilles et en réponse à l'ozone. Mesurée sur des extraits protéiques totaux, l'activité spécifique mesurée représente l'activité combinée des deux isoformes de la GS, la GS1 cytosolique et la GS2 chloroplastique. L'activité GS montre un profil comparable dans les FM et les FJ des arbres en air filtré, avec un creux à 21 jours suivi d'une tendance à la hausse à 35 jours. Pour ces deux étages foliaires, l'exposition à l'ozone est associée à une stimulation sensible de l'activité GS à partir de 21 jours (+120 % à 21 jours pour les FM et à 28 jours pour les FJ, $p < 0,05$). Pour les FE, l'activité GS mesurée à 35 jours de traitement affiche un niveau assez élevé en comparaison aux valeurs relevées dans les FJ et FM témoins, sans effet notable de l'ozone.

VI.3.2. Gels d'activité GS

Les mesures de l'activité spécifique totale de la GS ont été accompagnées de la révélation sur gel de cette même activité après séparation éléctrophorétique en conditions natives des protéines solubles totales (figure 50). De manière générale, les variations d'intensité de coloration entre les différents extraits sont corrélées à celles de l'activité GS mesurée dans ces mêmes extraits. Pour les feuilles témoins des trois étages foliaires (FM, FJ et FE) comme pour les FM traitées à 7 et 14 jours et les FE traitées à 35 jours, l'activité GS est associée à une unique bande colorée à environ 400 kDa. Pour les FM et le FJ traitées à 35 jours, on observe une deuxième bande colorée, plus diffuse et de taille plus importante, à environ 600 kDa. Dans ces extraits, l'apparition de cette bande s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la bande inférieure et d'une forte augmentation de l'activité GS totale.

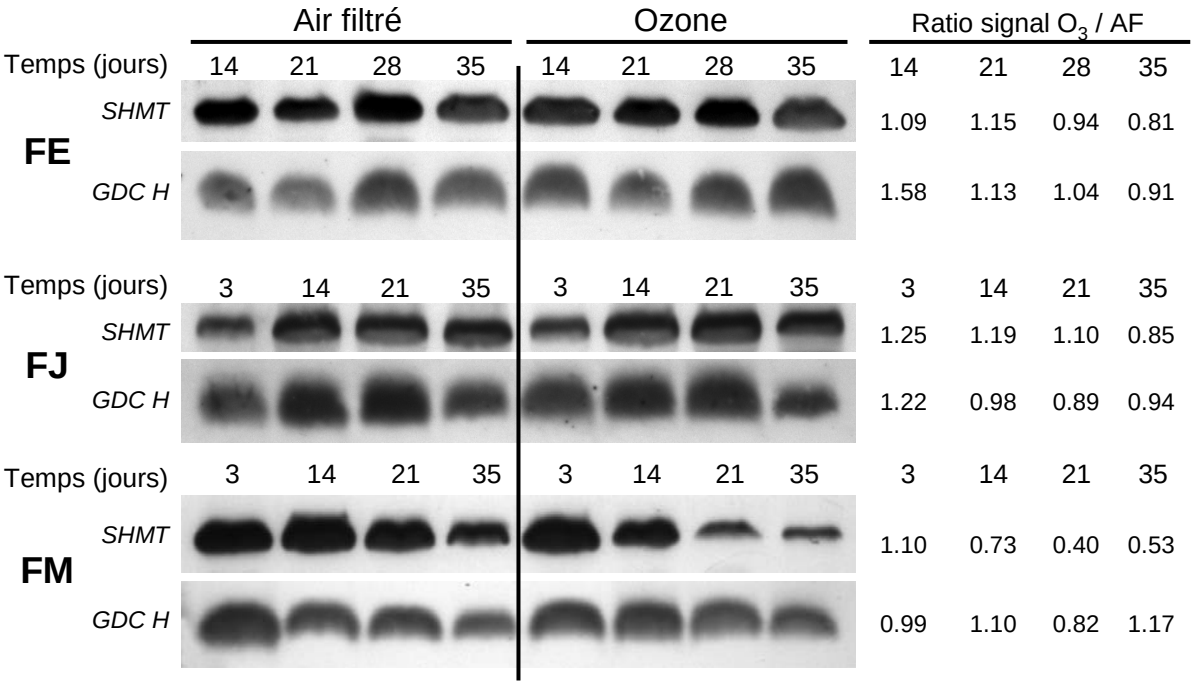


Figure 51 : Analyse par immunoblot de la quantité de sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) et de la sous-unité H de la glycine décarboxylase (GDC H) à partir d'extraits foliaires totaux de protéines solubles obtenus à 3, 14, 21 et 35 jours de traitement pour les FM (feuilles matures) et les FJ (feuilles jeunes), et à 14, 21, 28 et 35 jours pour les FE (feuilles en expansion). Les protéines d'intérêt sont détectées au moyen d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la SHMT et la GDC H purifiées à partir de feuilles de pois. Pour un même étage foliaire, le signal relatif aux deux protéines provient à chaque temps d'un même extrait foliaire et les extraits issus des deux traitement (ozone et air filtré) ont été analysés simultanément. La quantification de l'intensité des signaux obtenus permet de déterminer le rapport entre le signal mesuré pour les deux traitements, dont les valeurs sont indiqués dans la partie droite de la figure. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes, réalisées à partir d'extraits foliaires distincts.

VI.4. Immunodétection de la GDC H et de la SHMT

L'analyse par immunoblot des extraits foliaires totaux de peuplier au moyen d'anticorps polyclonaux dirigés contre des protéines purifiées à partir de feuilles de pois a permis de détecter deux polypeptides dont les masses moléculaires de 15 et 50 kDa correspondent respectivement à celles de la GDC H et du monomère de la SHMT (Vauclare *et al*. 1996). L'évolution avec le temps et en réponse à l'ozone des teneurs de ces deux protéines pour les trois étages foliaires étudiés est illustrée dans la figure 51. Pour chaque étage foliaire, la teneur des deux protéines évolue avec le temps de manière assez semblable. Dans les FM, la teneur en GDC H et en SHMT tend à diminuer avec le temps. Dans les FJ, elle tend au contraire à augmenter jusqu'à 21 jours, avant de décroître à 35 jours. Dans les FE enfin, elle ne varie pas avec le temps. L'exposition à l'ozone n'a pas d'effet marqué sur la teneur des deux protéines, à l'exception d'une diminution d'un facteur deux de la teneur en SHMT dans les FM traitées en comparaison aux témoins.

DISCUSSION

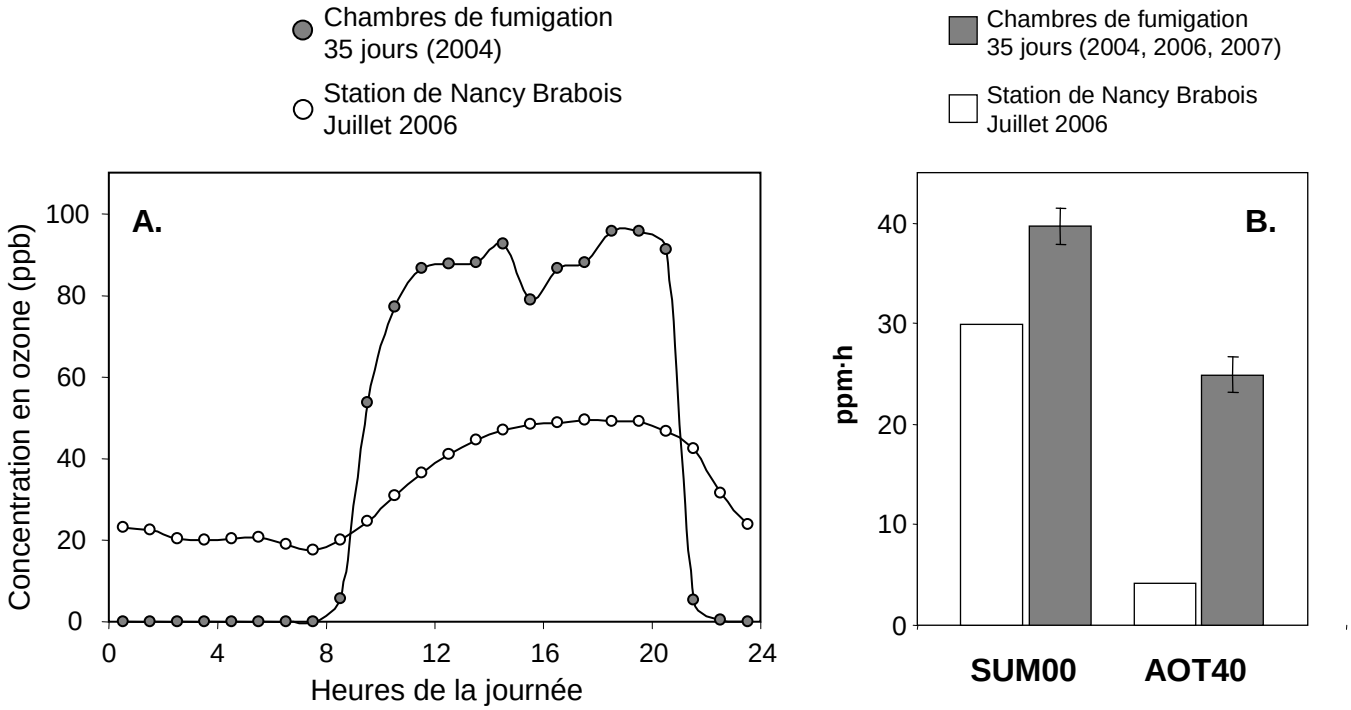


Figure 52 : **A**. Courbe journalière des moyennes horaires de concentration en ozone mesurée dans les chambres de fumigation en 2004 et dans l'air ambiant à la station de Nancy Brabois lors du mois de juillet 2006. Les valeurs de concentration correspondent pour chaque tranche horaire à la moyenne des mesures sur la période considérée (chambres de fumigation *n* = 35, air extérieur *n* = 31). En **B**., la moyenne des indices d'exposition à l'ozone SUM00 et AOT40 déterminés pour les trois périodes de fumigation est comparée à leurs valeurs calculées à partir des données recueillies à la station de Nancy Brabois lors du mois de juillet 2006.

Source : http://www.atmolor.org/

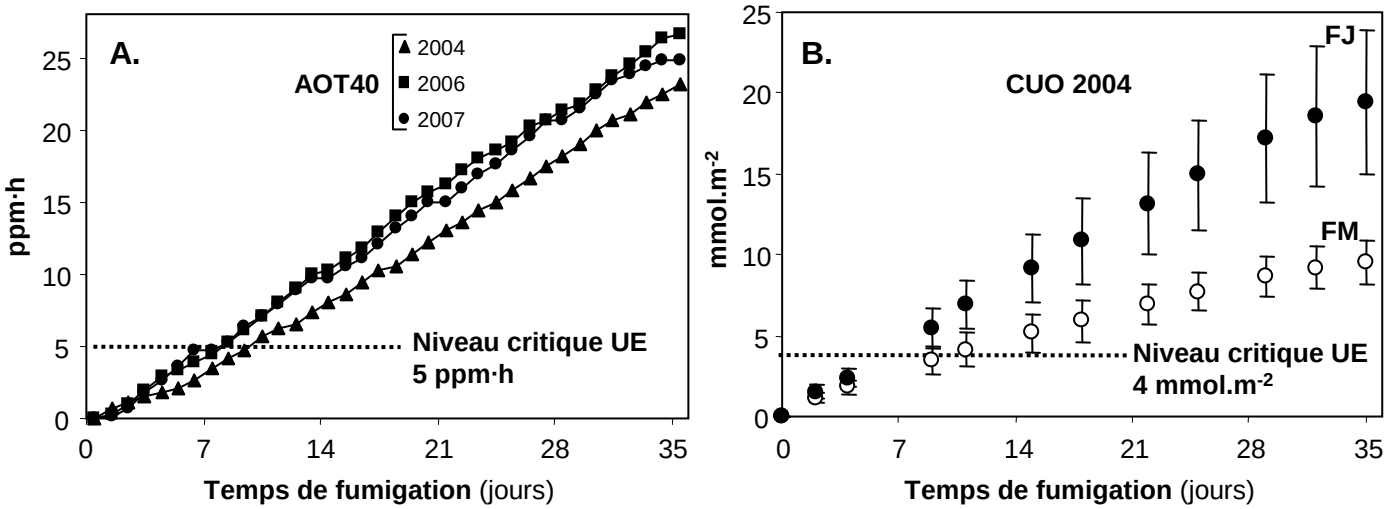


Figure 53 : Indices d'exposition à l'ozone (**A**. AOT40 et **B**. CUO) comparés aux seuils critiques correspondants adoptés en Europe. Ces seuils représentent un niveau d'exposition capable de provoquer une perte de biomasse de 10 % sur une saison de croissance. Ils sont basés sur la réponse du hêtre pour l'AOT40 et du hêtre et du bouleau pour le CUO (Paoletti & Manning 2007). Pour plus de précisions sur les graphes présentés, se reporter à la légende de la figure 34.

DISCUSSION

I. Effets de l'exposition à l'ozone à l'échelle de la plante entière

I.1. Exposition à l'ozone

La démarche expérimentale adoptée dans notre étude a consisté à soumettre des plants de peuplier âgés de trois mois à une exposition chronique à l'ozone en conditions contrôlées. Comme le montre la figure 32, la concentration effective à laquelle les arbres ont été exposés lors des trois expériences de fumigation est comprise entre 100 ppb et 120 ppb. L'exposition quotidienne en termes de moyennes horaires cumulées est légèrement plus faible en 2004 qu'en 2006 et 2007 mais cette différence est peu significative (figure 33). De plus, le niveau d'ozone journalier est équivalent d'une chambre à une autre pour une même expérience de fumigation. Si l'on compare la courbe journalière moyenne de concentration en ozone mesurée dans les chambres de fumigation à celle de la concentration en ozone mesurée dans l'air ambiant en juillet 2006 à la station de Nancy Brabois proche du laboratoire (figure 52.A), on constate que le niveau d'ozone atteint lors de notre étude est deux fois supérieur à celui relevé dans l'air ambiant. On note de plus que la durée quotidienne d'exposition maximale est plus importante dans nos conditions environnementales mais que le niveau basal de teneur en ozone dans l'air extérieur est de 20 ppb alors qu'il est nul en chambre de fumigation. La présence nocturne d'ozone dans l'air extérieur fait que l'exposition en termes de SUM00 dans nos conditions expérimentales est seulement 35 % plus forte qu'à l'extérieur (figure 52.B). Si l'on considère l'AOT40, qui ne prend en compte que les moyennes horaires diurnes supérieures à 40 ppb, le niveau d'ozone auquel ont été soumis les arbres dans notre étude se révèle six fois supérieur au niveau d'exposition potentiel pour le mois de juillet 2006 à Nancy. Sachant que les valeurs de SUM00 et d'AOT40 déterminées lors de ce mois particulièrement ensoleillé sont dans la gamme haute des valeurs enregistrées au niveau de l'agglomération nancéienne, l'exposition à l'ozone appliquée dans notre étude apparaît comparativement élevée, en particulier en termes d'AOT40. La figure 53 montre que l'AOT40 tout comme le CUO dépassent les niveaux critiques correspondants dès le début de la deuxième semaine de fumigation. Ces seuils critiques adoptés en Europe pour les arbres forestiers correspondent à un niveau d'exposition à l'ozone associé à une réduction de 10 % de la production de biomasse sur une saison de croissance. Ces éléments laissent apparaître que nos conditions expérimentales de fumigation ont été accompagnées d'une exposition à l'ozone relativement forte, en particulier pour une espèce

sensible comme le peuplier. Malgré le niveau d'ozone élevé, le traitement appliqué reste une exposition de type chronique mettant en jeu des teneurs en ozone rencontrées actuellement en milieu naturel sur des périodes courtes et susceptibles à moyen terme d'être atteintes sur des périodes plus longues.

Comme on peut le voir sur la figure 53.B, l'exposition à l'ozone en termes de CUO varie en fonction de l'étage foliaire considéré, avec en fin de traitement un CUO à 35 jours deux plus important pour les FJ que pour les FM. Cet écart, lié à la diminution de la conductance stomatique avec le développement foliaire (figure 41.C), illustre à l'échelle d'arbres juvéniles la difficulté à évaluer le niveau effectif d'exposition à l'ozone des arbres forestiers et le rôle prépondérant de la phénologie des feuilles.

I.2. Symptômes visibles

L'apparition de tâches nécrotiques sur la face supérieure des feuilles a constitué le premier symptôme visible chez les arbres exposés à l'ozone, sous la forme de tâches brun foncé de quelques mm² de surface au contour irrégulier (figure 37). Ces tâches ont évolué dans la plupart des cas en zones nécrosées de plusieurs cm² (figure 35.B). L'aspect de ces zones de nécrose est comparable à celui des symptômes décrits par Bussotti *et al.* (2006) pour des espèces d'arbres forestiers dans le cadre d'une étude des dommages visibles dus à l'ozone sur la végétation naturelle de Suisse et d'Italie. Dans notre étude, les premières tâches nécrotiques ont été observées 4 à 6 jours après le début de la période de fumigation sur des feuilles pleinement développées en position intermédiaire. Les feuilles matures plus âgées, dont celles de l'étage foliaire FM, ont également montré des symptômes visibles mais ceux-ci sont apparus plus tardivement. Tout au long de la période de fumigation, les feuilles en début d'expansion comme les FE n'ont pas exhibé de tâches nécrotiques. Les feuilles appartenant à l'étage foliaire FJ, dont le développement s'est déroulé pendant la période de fumigation, n'ont montré des tâches nécrotiques qu'à partir de la troisième semaine de traitement, alors qu'elles venaient d'atteindre leur pleine expansion (figure 40). Ces observations confirment la plus grande sensibilité des feuilles matures par rapport aux feuilles jeunes en termes de dommages visibles dus à l'ozone (Strohm *et al.* 1999). De plus, les feuilles qui viennent d'achever leur expansion apparaissent particulièrement sensibles. Ce stade de développement foliaire, qui correspond à la transition du statut d'organes *puits* à celui d'organes *sources*, constitue la période de sensibilité maximale aux contraintes biotiques (pathogènes, insectes) mais aussi à l'ozone (Coleman 1986).

La mise en évidence de peroxyde d'hydrogène en bordure des tissus nécrosés témoigne de l'implication de cette ROS dans la formation des lésions nécrotiques en réponse à l'ozone (Pellinen *et al.* 1999). La distribution du peroxyde d'hydrogène à la surface des feuilles traitées n'est pas homogène mais localisée à la périphérie des nécroses et le long des nervures, comme

il a été montré chez d'autres espèces en réponse à l'ozone et en cas d'interactions plantes-pathogènes (Wohlgemuth *et al.* 2002). La nature des ROS impliquées dans le stress oxydatif et l'induction du processus de mort cellulaire associés à l'ozone peut varier d'une espèce végétale à une autre. L'apparition de lésions nécrotiques est ainsi corrélée à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène pour le tabac, la tomate et le bouleau, mais plutôt à celle de l'anion superoxyde pour *Arabidopsis*, l'oseille et la mauve (Wohlgemuth *et al.* 2002). Dans le cadre de notre étude, le peroxyde d'hydrogène a notamment été localisé au niveau de zones non nécrosées alors que la présence de l'anion superoxyde a été observée sous la forme de plages relativement étendues et contiguës aux zones nécrosées mais jamais au niveau de zones non nécrosées (données non présentées). Ces observations indiquent que le peroxyde d'hydrogène, plutôt que l'anion superoxyde, semble jouer un rôle privilégié dans l'initiation du phénomène de nécrose tissulaire chez le peuplier. Une hypothèse pouvant expliquer l'accumulation préférentielle de peroxyde d'hydrogène pourrait être l'activation des SOD, qui catalysent la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et dont la stimulation en réponse à un stress oxydatif a été mise en évidence (Alscher *et al.* 2002). Le rôle du peroxyde d'hydrogène comme molécule signal en réponse à de nombreux stress abiotiques (Chamnongpol *et al.* 1998) et lors de l'interaction plante-pathogène est bien connu (Levine *et al.* 1994). À faible concentration, il permet la régulation d'un certain nombre de gènes impliqués dans les systèmes de défense cellulaire mais se révèle toxique à forte concentration et contribue au déclenchement du processus de mort cellulaire (Pellinen *et al.* 2002).

Un autre symptôme associé à l'exposition à l'ozone est la diminution de l'intensité de la coloration verte des feuilles (figures 35.A et 37). Cette observation est corrélée à la réduction de la teneur en chlorophylles totales dans les feuilles pleinement développées (FJ et FM, figure 41.A). Ce phénomène de chlorose généralisée est particulièrement prononcé chez les feuilles dont l'expansion s'est déroulée au moins en partie en présence d'ozone. La teneur en chlorophylles totales dans les FJ témoins augmente de manière considérable en fin de deuxième semaine d'expérience, au moment où elles atteignent leur pleine expansion (figure 40). Dans les FJ traitées, cette augmentation brutale est absente, ce qui explique l'écart important de coloration entre les deux traitements pour ce type de feuilles. La teneur en chlorophylles tend à décliner avec le temps de manière plus précoce et plus prononcée dans les FM traitées que dans les témoins, tout comme les divers paramètres photosynthétiques mesurés. De plus, une défeuillaison marquée des arbres exposés à l'ozone a été relevée lors des 10 derniers jours de fumigation (figures 35.C et 36). À l'issue des 35 jours de traitement, le taux d'abscission foliaire par arbre est 35 % plus important pour les arbres exposés que pour les témoins (tableau 3). Ces résultats confirment dans nos conditions expérimentales l'induction par l'ozone d'une sénescence accélérée. Un tel phénomène est une réponse commune des plantes à une exposition chronique prolongée à l'ozone (Pell *et al.* 1997, Ojenperä *et al.* 1998), observée pour

une variété d'arbres caducifoliés comme le hêtre (Nunn *et al.* 2005), le bouleau (Pääkkönen *et al.* 1997) et des espèces méditerranéennes (Ribas *et al.* 2005). L'observation d'une sénescence précoce a aussi été rapportée pour différentes espèces de peuplier exposées à l'ozone en OTC : *P. maximowiczii* (Brendley & Pell 1998), *P. tremula* (Matyssek *et al.* 1993), *P. nigra* (Bortier *et al.* 2000b).

Le dernier symptôme visible relevé au niveau des arbres exposés à l'ozone est la perte de l'aspect brillant de la face supérieure des feuilles (figure 35.A), signe d'une possible altération des cires épicuticulaires. Cette observation a été relevée sur les feuilles dont l'expansion s'est déroulée pendant la fumigation mais pas sur les feuilles déjà pleinement développées en début de fumigation, ce qui laisse penser que la perte de brillance observée provient d'un défaut de dépôt des cires épicuticulaires plutôt que de leur dégradation directe par l'ozone. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les cires épicuticulaires se montrent *in vitro* particulièrement résistantes à l'ozone (Jetter *et al.* 1996, Vanhatalo *et al.* 2001). Ces modifications de la cuticule des feuilles des arbres traités pourraient être reliées à la perturbation du métabolisme carboné occasionnée par le polluant *via* une possible restriction des ressources allouées à la synthèse des cires épicuticulaires.

I.3. Impact sur la croissance

En plus des symptômes visibles décrits dans le paragraphe précédent, l'exposition à l'ozone, dont on a vu qu'elle a dépassé dès la deuxième semaine de fumigation les seuils critiques d'AOT40 et de CUO admis pour les arbres, a affecté de manière négative un certain nombre de paramètres associés à la croissance et à l'accumulation de biomasse. Ainsi, la production totale de biomasse pendant les 35 jours de traitement a été réduite de 18 % en termes de matière fraîche et de 9 % en termes de matière sèche (tableau 3). L'écart entre ces deux niveaux de réduction s'explique par une diminution significative de l'humidité pondérale de la plante entière (-12 %). Les réductions notées pour ces trois paramètres se répartissent entre racines, tige et feuilles (figure 38), avec un effet sensiblement plus fort pour les racines. La diminution potentielle de la capacité d'absorption racinaire causée par cette réduction de croissance des parties racinaires pourrait en partie rendre compte de l'humidité pondérale réduite des plants traités. La réduction de l'allocation de carbone aux parties racinaires est souvent observée en réponse à l'ozone (Grantz *et al.* 2006). Par l'utilisation d'un modèle de croissance du peuplier, Martin *et al.* (2001) suggèrent que l'ozone pourrait réduire la croissance racinaire en provoquant la sénescence accélérée des feuilles basses, principales sources de photosynthétats pour les racines. L'abscission des feuilles basses a précisément été observée dans notre étude, ce qui tend à appuyer cette hypothèse.

Bien que la production de biomasse des arbres traités montre une nette tendance à la baisse, le taux de croissance relative (RGR) de la plante entière ne se révèle que faiblement affecté par l'ozone (-4 %). Ceci provient d'une part de l'expression du RGR en fonction de la matière sèche et d'autre part de la durée relativement courte de la période de traitement. Il parait vraisemblable que la production de biomasse aurait été plus fortement réduite si la fumigation avait été prolongée. En outre, l'analyse d'effectifs relativement restreints (n = 8), due à la nature destructive des mesures, limite la significativité statistique des résultats.

L'effet négatif de l'ozone sur la production de biomasse a été accompagné d'une réduction significative de 13 % de la croissance radiale de la tige sans que sa croissance en hauteur ne soit affectée (tableau 3). Cette réduction de croissance radiale apparaît dès 25 jours de traitement mais n'est significative qu'à 35 jours. Bortier *et al.* (2000b) ont également montré un effet de l'ozone plus marqué sur la croissance en diamètre que sur la croissance en hauteur de plants juvéniles de *P. nigra* en OTC. Dans les conditions de densité de culture relativement élévée des chambres de fumigation fermées ou à ciel ouvert (OTC), on peut émettre l'hypothèse que les arbres traités, dont la photosynthèse et donc la production de biomasse sont réduites, maintiennent leur croissance en hauteur au détriment de leur croissance en diamètre de manière à conserver un accès à la lumière.

La réduction de biomasse relevée en fin de fumigation résulte également du taux d'abscission foliaire plus important chez les arbres traités. Certains travaux ont mis en évidence pour le peuplier une augmentation du nombre de nouvelles feuilles formées en réponse à l'ozone pouvant permettre de compenser la sénescence accélérée provoquée par le polluant (Reich 1987, Woodbury *et al.* 1994). Dans notre étude, les arbres traités affichent une augmentation non significative de 7 % du taux de néoformation de feuilles qui parait insuffisante pour compenser l'abscission foliaire accrue. En fin de traitement, la photosynthèse des arbres exposés est donc assurée par un nombre réduit de feuilles, dont la capacité photosynthétique est de surcroît affectée par l'ozone (figures 41 à 46), ce qui peut expliquer en partie la réduction de la production de biomasse. De telles réductions de croissance ont été mesurées pour le peuplier (*P. tremula x alba*, Cabané *et al.* 2004 ; *P. nigra*, Bortier *et al.* 2000b) et pour d'autres espèces d'arbres caducifoliés (bouleau, Oksanen & Holopainen 2001 ; hêtre, Nunn *et al.* 2005) dans le cadre d'expériences de fumigation comparables.

À l'issue de la période de fumigation, la surface spécifique (SLA) globale des feuilles des arbres traités est 12 % inférieure à celle des feuilles des arbres en air filtré (tableau 3). Cette réduction significative peut être liée à l'accumulation dans les feuilles exposées de métabolites (flavonoïdes, stillbènes, polyphénols pariétaux, polyamines) pouvant jouer un rôle de protection (Langebartels *et al.* 1997). En particulier, Cabané *et al.* (2004) ont mis en évidence une stimulation de la synthèse des lignines dans les feuilles de jeunes plants de la même espèce de

peuplier (*P. tremula x alba*) exposés à 120 ppb en ozone pendant un mois dans des conditions expérimentales identiques aux nôtres. Les lignines accumulées en réponse à l'ozone montraient de plus une densité plus importante que celle des feuilles témoins. Les auteurs concluent que la synthèse accrue de lignines condensées en réponse à l'ozone pourrait constituer un mécanisme de protection contre le polluant en renforçant la barrière formée par la paroi cellulaire.

Les résultats obtenus à l'échelle de la plante entière indiquent un effet appréciable de l'ozone sur la croissance des peupliers étudiés, et ce, malgré la durée relativement courte de la période de fumigation. La partie suivante, consacrée à l'impact de l'ozone sur le métabolisme primaire à l'échelle de la feuille, voire de la cellule, permettra de mettre en évidence l'une des causes principales de la réduction de croissance qui est l'atteinte de la photosynthèse. Nous verrons de plus que le stade de développement foliaire influe sur la sensibilité à l'ozone des processus photosynthétiques.

II. Impact sur le métabolisme primaire lors du développement foliaire

II.1. Développement foliaire

L'évolution au cours de la période d'expérience de la surface individuelle, de la teneur en chlorophylles (Chl) et des échanges gazeux (A et g_s) des feuilles témoins des trois étages foliaires étudiés (FM, FJ et FE) permet de décrire leur développement (figures 40 et 41). La surface foliaire et la teneur en Chl constantes des FM confirment que ces feuilles étaient pleinement développées au début de la période de traitement. La diminution régulière avec le temps de A et g_s sans chute brutale de la teneur en Chl indique que les FM se sont maintenues pendant les 35 jours d'expérience à un stade de développement intermédiaire entre le stade d'activité photosynthétique maximale et celui de la sénescence. L'absence d'abscission foliaire pour les FM témoins confirme l'idée que ces feuilles sont restées métaboliquement actives en tant qu'organes *sources* tout au long de la période d'étude. On remarque que la surface foliaire supérieure à 3 dm² des FM est particulièrement élevée pour le peuplier, mais la surface des feuilles des arbres juvéniles est généralement plus importante que celle des feuilles des arbres adultes (Augspurger & Bartlett 2003).

Pour les FJ, les deux premières semaines d'expérience sont marquées par une augmentation importante de la surface, de la teneur en Chl et de g_s tandis que A se maintient à un niveau relativement haut. À partir de 14 jours d'expérience, temps auquel les FJ ont achevé leur

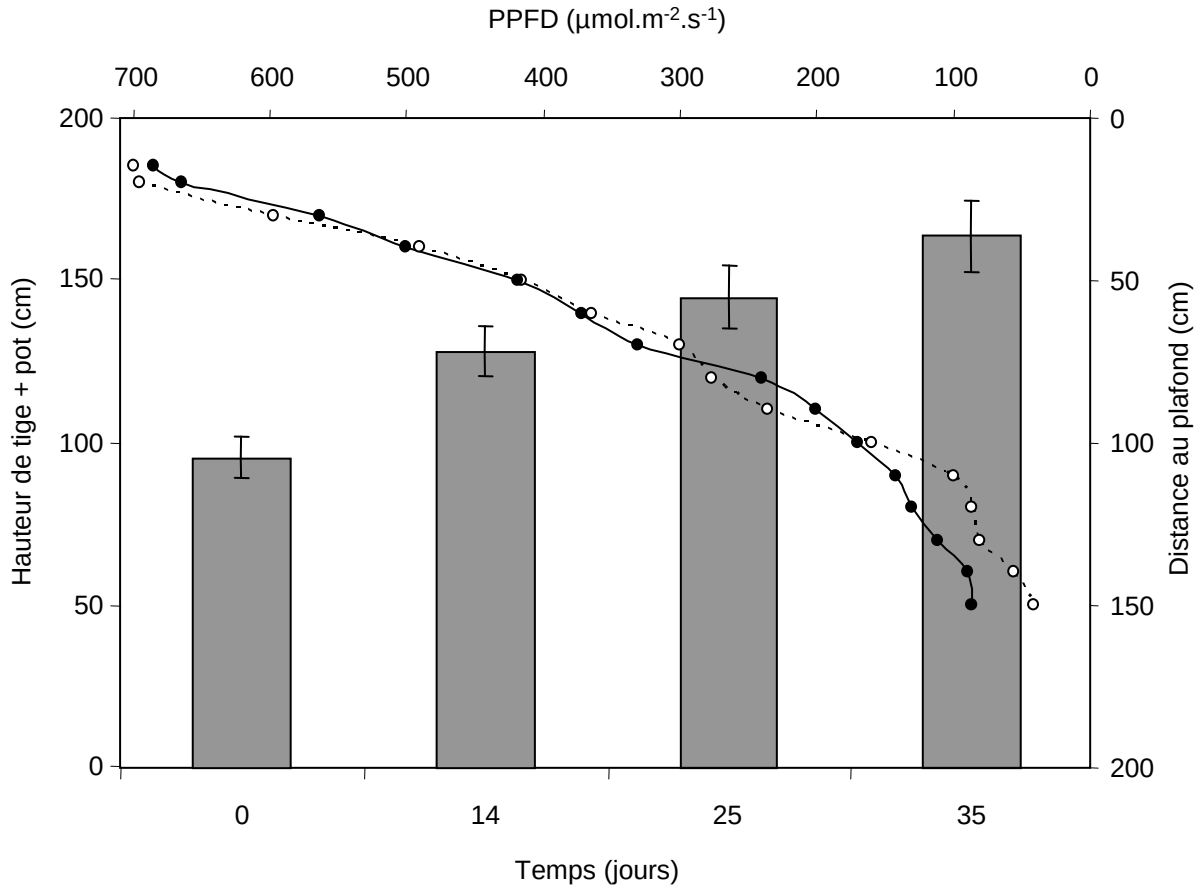


Figure 54 : Intensité lumineuse dans les chambres de fumigation et croissance des arbres.
Courbes (axes dans le coin supérieur droit) : évolution de l'intensité lumineuse (PPFD) en fonction de la distance par rapport au plafond dans deux chambres de fumigation (chambre #1 : ligne continue et cercles pleins ; chambre #6 : ligne pointillée et cercles ouverts).
Histogrammes (axes dans le coin inférieur gauche) : évolution au cours de l'expérience de la hauteur moyenne des arbres, pot compris (moyenne ± écart-type, *n* = 64 à 80).

expansion, *A* et g_s décroissent sensiblement jusqu'à la fin de la période de traitement. La teneur en Chl atteint quant à elle son niveau maximal à 21 jours puis diminue également. Après une phase d'expansion pendant laquelle les FJ présentent un statut d'organes *puits*, ces feuilles atteignent en même temps que leur expansion maximale un stade de maturité physiologique au cours duquel elles deviennent des organes *sources*. Les caractéristiques physiologiques (teneur en Chl, *A* et g_s) des FJ en fin d'expérience s'avèrent équivalentes à celles des FM en début d'expérience. On note cependant que la surface foliaire maximale des FJ est inférieure à celle des FM. Cet écart peut être causé par les conditions environnementales légèrement différentes qui ont accompagné la phase d'expansion de ces deux types de feuilles. Les FM se sont en effet développées en salle de culture alors que les FJ ont achevé leur expansion en chambre de fumigation. Même si les conditions de lumière, de température et de humidité relative sont identiques dans les deux types d'enceintes, la taille plus réduite des chambres de fumigation ainsi qu'une densité de culture plus importante ont vraisemblablement restreint la taille maximale des feuilles.

Les FE ne forment pas un *étage foliaire* au même titre que les FJ et FM, qui ont été suivies pendant les 35 jours de traitement, mais correspondent plutôt à un *stade de développement* précis, qui est celui des FJ au temps 0. Un nouvel échantillon de FE équivalentes en termes de développement foliaire a été pris en compte à chaque temps de mesure à partir de 14 jours, ce qui explique que, malgré leur nom (*feuilles en expansion*), la surface de FE n'augmente pas avec le temps et affiche une valeur comparable à celle des FJ à temps 0. On note toutefois que la teneur en Chl, *A* et g_s s'accroissent nettement avec le temps. Ces augmentations résultent sans doute de la croissance en hauteur des arbres. À chaque temps de mesure, les FE analysées sont situées à l'apex des plants et se trouvent ainsi de plus en plus proches des lampes. Entre 14 et 35 jours, la PPFD reçue par les FE passe ainsi de 350 à 500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (figure 54), ce qui a stimulé l'activité photosynthétique de ces feuilles.

L'analyse des feuilles des étages foliaires FM et FJ permet d'étudier les effets de l'ozone tout au long du développement foliaire, depuis la phase précoce d'expansion jusqu'au stade précédant la sénescence. L'étude des FE permet quant à elle d'évaluer la sensibilité des feuilles à un stade de développement précoce à différents temps d'exposition à l'ozone. Le développement foliaire lui-même apparaît peu affecté par l'ozone puisque ni la valeur maximale de surface foliaire pour les trois étages foliaires ni la date à laquelle cette valeur a été atteinte pour les FJ n'ont été modifiées de manière significative par le traitement (figure 40). L'exposition à l'ozone montre en 2004 une légère tendance à ralentir l'expansion foliaire des FJ et à accélérer celle des FE, mais les données de 2006 n'ont pas confirmé ces résultats. L'impact de l'ozone porte avant tout sur le métabolisme primaire et en particulier sur les processus photosynthétiques.

II.2. Réduction de la capacité photosynthétique des feuilles matures

II.2.1. Impact sur la fixation du CO_2 atmosphérique

L'exposition à l'ozone réduit de manière significative l'assimilation nette de CO_2 des FM dès 10 jours de fumigation et celle des FJ à partir de la troisième semaine de traitement, alors que ces dernières ont achevé leur expansion (figure 41.B). L'effet négatif du traitement sur la photosynthèse se manifeste donc sur les feuilles pleinement développées. On observe que l'assimilation est affectée sans que la conductance stomatique ne soit modifiée (figure 42.C). La réduction de l'assimilation semble donc résulter de l'atteinte des processus biochimiques de la photosynthèse et non d'une limitation de la concentration en CO_2 dans le mésophylle. La réduction coordonnée du coefficient directeur de la partie linéaire et du niveau du plateau des courbe A/C_i pour les FM et les FJ à 20 et 35 jours (figure 42) indique que l'exposition à l'ozone affecte les processus photosynthétiques associés à la fois à la photochimie et à la fixation du CO_2 atmosphérique. La restriction par l'ozone de la capacité de fixation du CO_2 est illustrée par la diminution du paramètre V_{cmax} et de l'activité spécifique de la rubisco dans les FJ et les FM traitées à partir de 20 jours de fumigation (figures 43 et 45). La rubisco est une enzyme particulièrement sensible à l'ozone dont l'activité, la quantité et la transcription sont réduites par l'ozone (Pell *et al.* 1994a , Pelloux *et al.* 2001). L'effet d'une exposition chronique à l'ozone sur la rubisco a ainsi été rapporté pour le peuplier (Pell *et al.* 1992), l'érable (Gaucher *et al.* 2003), le hêtre (Lutz *et al.* 2000) et le bouleau (Matyssek *et al.* 1991). Les résultats de l'analyse protéomique réalisée sur les FJ et présentée dans l'Annexe 1 montrent une diminution à 35 jours de la quantité de protéines de la petite sous-unité de la rubisco, de la rubisco activase et de plusieurs enzymes du cycle de Calvin (triose-phosphate isomérase, aldolase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, ribulose-5-phosphate-3-épimérase et phosphoribulokinase) (Annexe 1, tableau 1). La limitation de la capacité photosynthétique traduit donc des modifications significatives de la capacité enzymatique de fixation du CO_2.

II.2.2. Impact sur la photochimie

Les paramètres photochimiques (J_{max}, Φ_{PSII}, qP et F_v/F_m) sont également réduits de manière significative à partir de 20 jours dans les FJ et les FM (figures 43 et 44). La réduction du flux d'électrons photosynthétiques (J_{max}) et de la fraction de l'énergie lumineuse utilisée par la photochimie (ou rendement quantique, Φ_{PSII}) indique une diminution globale de la capacité photosynthétique. La réduction du *quenching* photochimique (qP) manifeste quant à elle une saturation de la photochimie par la lumière pouvant provenir de l'utilisation réduite du NADPH et de l'ATP par le cycle de Calvin tout autant que de l'altération des photosystèmes. Seule la baisse

du rapport F_v/F_m montre que la photochimie en elle-même a été affectée par l'exposition à l'ozone, *via* l'altération directe des systèmes responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse et du transport des électrons photosynthétiques. L'impact négatif de l'ozone sur la photochimie est documenté pour le peuplier (Guidi *et al.* 2001), le hêtre (Bortier *et al.* 2000a) ou encore le bouleau (Shavnin *et al.* 1999), mais on estime que les processus biochimiques de fixation du CO_2 sont plus sensibles que ceux associés à la photochimie (Saxe 2002), ce que corroborent nos résultats. En effet, la réduction limitée de F_v/F_m par rapport aux autres paramètres photosynthétiques suggère que la photochimie est affectée après les processus de fixation du CO_2 et qu'elle n'explique qu'en partie la limitation de la capacité photosynthétique due à l'ozone.

La perturbation des processus photochimiques par l'ozone peut être associée à la diminution des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) et à la déstabilisation de l'antenne collectrice du PSII (Saxe 2002). Ces deux aspects sont observés dans notre étude. Une diminution de la teneur en chlorophylles totales apparaît dès 7 jours pour les FM et 14 jours pour les FJ (figure 41.A). Cette réduction touche surtout la Chl a à 14 jours et les Chl a et b à 35 jours (Annexe 1, figure 4). La Chl b étant majoritairement présente au niveau du PSII, la diminution simultanée des teneurs en Chl a et b indique une dissociation possible de l'antenne collectrice de PSII, ce qui concorde avec la diminution observée de la quantité de protéines constitutives du PSII (Annexe 1, tableau 1). La baisse de la concentration en lutéine dans les FJ à partir de 14 jours (Annexe 1, figure 4) peut également provenir de la dissociation des antennes collectrices, mais aussi de l'intervention de ce pigment caroténoïde en tant qu'antioxydant (Bohler *et al.* 2007).

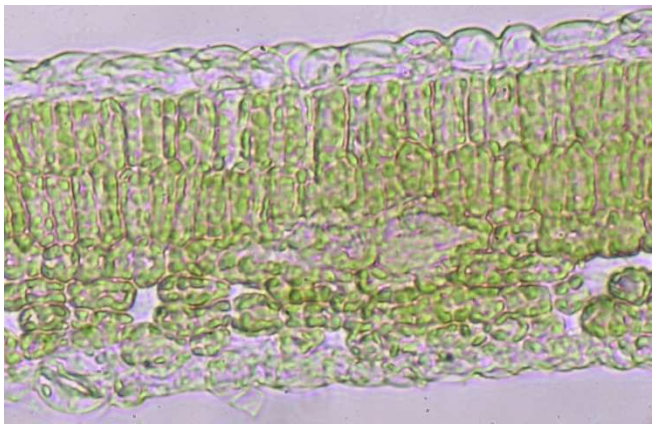
De manière générale, il parait clair que la restriction de la capacité photosynthétique provoquée par l'ozone résulte dans nos conditions expérimentales d'effets combinés sur les processus anaboliques (cycle de Calvin) et photochimiques (pigments, photosystèmes).

II.3. Évolution de la sensibilité à l'ozone au cours du développement foliaire

II.3.1. Résistance des feuilles en phase précoce de développement

Contrairement aux feuilles pleinement développées, les feuilles à un stade précoce de développement (FJ avant 14 jours et FE) se montrent particulièrement résistantes à l'ozone en termes de symptômes visibles et de photosynthèse. Pour cette classe de feuilles, aucun des paramètres photosynthétiques étudiés n'a été modifié de façon prononcée par l'ozone (figures 41 à 45). Tout au plus peut-on relever quelques modifications significatives, mais ponctuelles et de faible ampleur, pour les FE et une tendance à la baisse des indices associés à la fluorescence

A.



B.

Figure 55 : Coupe transversale de feuilles de peuplier à deux stades de développement (**A**. feuille jeune FJ ; **B**. feuille mature FM) à temps 0 (coupes transversales de 15 µm d'épaisseur, observation au microscope photonique, grossissement 40 fois).

chlorophyllienne en réponse à l'ozone pour les FJ (figure 44). La résistance forte des feuilles en expansion, qui contraste avec la sensibilité marquée des feuilles matures, est une caractéristique commune de la réponse des arbres caducifoliés à l'ozone, particulièrement documentée pour le bouleau (Landolt *et al.* 1997, Maurer *et al.* 1997, Oksanen *et al.* 2005) et le peuplier (Reich 1983, Coleman 1986, Strohm *et al.* 1999). Elle s'accompagne parfois d'une stimulation transitoire de la photosynthèse dans les feuilles jeunes qui pourrait indiquer des mécanismes de compensation en réponse à la réduction de la capacité photosynthétique des feuilles plus âgées (Greitner *et al.* 1994, Maurer *et al.* 1997, Brendley & Pell 1998). Aucune stimulation de la photosynthèse des FE et des FJ traitées n'a toutefois été relevée dans nos conditions expérimentales. Les FE traitées affichent globalement une surface foliaire et une activité rubisco supérieures à celles des témoins, mais l'écart observé demeure modeste.

L'absence de modification de la conductance stomatique des feuilles en phase précoce d'expansion (figure 41.C) et le CUO élevé (figure 34.B) des FJ indiquent que la résistance à l'ozone des feuilles jeunes ne provient pas d'une exposition moindre à l'ozone mais plutôt de caractéristiques intrinsèques. Une plus grande densité cellulaire du mésophylle des feuilles jeunes en comparaison aux feuilles matures a été observée chez le peuplier (Fares *et al.* 2006) et le bouleau (Oksanen *et al.* 2005). Dans les deux cas, les auteurs suggèrent que la compacité plus importante du mésophylle permet de limiter la diffusion de l'ozone au sein des tissus photosynthétiques et de réduire ainsi la toxicité du polluant. Les résultats préliminaires de l'analyse de l'anatomie des feuilles dans nos conditions expérimentales confirment la compacité supérieure du mésophylle des FE par rapport à celui des FM (figure 55). La comparaison à venir des volumes des espaces intercellulaires dans les feuilles des trois étages foliaires d'arbres traités et en air filtré permettra d'une part de valider ce résultat et d'autre part de vérifier si des modifications du degré de compacité du mésophylle apparaissent en réponse à l'ozone.

Les tissus foliaires des feuilles en expansion (FJ avant 14 jours et FE) montrent de manière générale une activité métabolique plus intense que celle des feuilles plus âgées (FJ après 14 jours et FM). Cette différence se traduit par des valeurs plus élevées pour la plupart des paramètres photosynthétiques (figures 41 à 45), respiratoires (figure 47) et photorespiratoires (figure 48). Cette activité métabolique plus intense peut provenir de l'accès privilégié de ces feuilles à la lumière. L'effet de la proximité croissante des lampes a été décrit pour les FE (paragraphe II.1 de la présente section). Concernant les FJ, la différence d'illumination liée à la différence de hauteur par rapport aux FM est relativement limitée, mais les FJ ont tout de même bénéficié d'une absence totale d'ombrage lors de la première semaine de traitement. Le statut d'organes *puits* des feuilles en expansion contribue sans doute aussi à stimuler leur métabolisme. Une activité métabolique plus forte pourrait permettre aux feuilles en expansion précoce d'alimenter plus efficacement les processus de détoxication et de réparation, leur apportant une capacité plus importante de lutte contre le stress oxydant provoqué par l'ozone.

L'activation des voies de détoxication est un effet établi de l'exposition à l'ozone (Sharma & Davis 1997, Sehmer *et al.* 1998). Strohm *et al.* (2002) ont montré pour le peuplier hybride *P. tremula x alba* que la surexpression de la glutathion réductase et la glutathion synthétase apportait une résistance supérieure à une exposition aiguë à l'ozone, en particulier pour les feuilles jeunes. Pour autant, la stimulation des activités foliaires de ces deux enzymes s'est révélée indépendante du stade de développement des feuilles. La résistance à l'ozone des feuilles jeunes ne viendrait donc pas seulement d'une capacité antioxydante accrue mais aussi de caractéristiques intrinsèques, en l'occurrence d'un métabolisme plus actif, leur permettant d'alimenter les processus de détoxication.

II.3.2. Réponse différentielle au CUO

La comparaison de la réponse au CUO de l'assimilation nette de CO_2 et de l'activité rubisco des FJ et des FM illustre la capacité intrinsèque de résistance à l'ozone plus importante des feuilles jeunes (figure 46). En effet, pour une même dose effective d'ozone pénétrant dans le mésophylle, la réduction de ces deux paramètres s'avère moins forte dans les FJ que dans les FM. L'écart entre les droites de régression linéaire tracées pour chacun des étages foliaires indique en outre que la résistance des FJ s'est prolongée au-delà de leur phase d'expansion, ce qui suggère un phénomène d'acclimatation à l'ozone. Cette acclimatation potentielle apparaît néanmoins insuffisante pour protéger les FJ puisque le niveau de réduction des trois paramètres considérés (teneur en Chl, *A* et activité rubisco) atteint en fin de traitement dans les FJ celui des FM. La réponse au CUO de la teneur en chlorophylles totales se révèle similaire pour les deux étages foliaires. La diminution de la teneur en chlorophylles pourrait donc constituer une réponse spécifique à l'ozone des feuilles, indépendamment du stade de développement qui est le leur au moment de l'exposition au polluant. Par ailleurs, la corrélation entre le niveau de réduction de l'assimilation et celui de l'activité rubisco pour les deux étages foliaires tend à confirmer que l'atteinte de la capacité de fixation du CO_2 explique en grande partie la diminution de la photosynthèse.

II.3.3. Perte de la résistance à l'ozone et transition *puits/source*

La phase d'expansion des FJ est marquée par leur résistante à l'ozone en termes de symptômes visibles et de photosynthèse. L'apparition de tâches nécrotiques et la réduction des paramètres photosynthétiques coïncident avec la fin de cette phase d'expansion. En réponse à l'ozone, la teneur en Chl des FJ est ainsi réduite dès 14 jours (figure 41.A), tandis que l'assimilation et l'activité rubisco sont significativement affectées à partir de 21 jours (figures 41.B et 45.A). Les caractéristiques des courbes A/C_i et la valeur des paramètres dérivés (V_{cmax} et J_{max})

ne sont modifiées qu'à partir de 20 jours, tout comme les paramètres liés à la fluorescence chlorophyllienne (Φ_{PSII}, qP et F_v/F_m), même si, pour ces derniers, une tendance à la baisse se dégage dès 10 jours. La période de transition de la résistance vers la sensibilité à l'ozone des FJ semble donc se situer entre 10 et 20 jours, ce qui correspond à la fin de leur phase d'expansion et à l'acquisition du statut d'organes *sources*. Dans les FJ des arbres témoins, cette phase de transition *puits*/*source* est marquée par une augmentation considérable de la teneur en chlorophylles et de l'activité rubisco (figure 41.A et 45). De manière générale, les paramètres métaboliques étudiés atteignent leur niveau maximal à 20 jours, à l'issue de cette phase de transition (figures 41 à 45, 47, 48 et 51). Les évènements physiologiques qui accompagnent la transition *puits*/*source* des feuilles en développement sont particulièrement documentés pour le peuplier (Coleman 1986). Le métabolisme carboné s'oriente notamment vers la synthèse de saccharose pour l'export à destination des organes *puits*. Dans les feuilles de peupliers qui viennent d'achever leur expansion, la part du carbone assimilé consacrée à la synthèse de saccharose passe ainsi brutalement de 25 à 85 % (Dickson & Larson 1981). La croissance continue des espèces comme le peuplier exerce une pression métabolique importante sur les feuilles qui entrent dans la phase de transition *puits*/*source* (Coleman 1986, Paul & Foyer 2001) sans que ces dernières ne disposent de réserves carbonées conséquentes (Dickson & Larson 1981). En cas d'exposition à l'ozone, ces feuilles ne peuvent vraisemblablement pas répondre à la demande métabolique exigée conjointement par la lutte contre le stress oxydatif et par la transition *puits*/*source*. Cette incapacité potentielle à alimenter les processus de détoxication et de réparation pourrait expliquer la perte de résistance à l'ozone des feuilles en développement lors de la transition *puits*/*source*. Cette phase précise du développement foliaire est d'ailleurs considérée comme la période où les feuilles sont les plus sensibles à l'ozone (Coleman 1986). Nos résultats corroborent cette observation puisque les FJ pleinement développées sont plus fortement affectées par l'exposition à l'ozone que les FM. Par ailleurs, la transition *puits*/*source* est caractérisée par des modifications morphologiques telle que l'augmentation des espaces intercellulaires (Coleman 1986). Cette différenciation du mésophylle, qui vise en premier lieu à favoriser les échanges gazeux, pourrait dans le même temps augmenter la diffusion de l'ozone et exacerber sa toxicité vis-à-vis des tissus photosynthétiques. La figure 55 illustre les différences morphologiques entre feuilles en expansion et matures. Des analyses histologiques plus approfondies apporteront des éléments quant au rôle de la différenciation du mésophylle dans l'acquisition de la sensibilité à l'ozone lors du développement foliaire.

II.3.4. Sénescence accélérée des feuilles matures

Dans les FM des arbres témoins, la plupart des paramètres photosynthétiques diminuent en fin d'expérience, marquant l'approche de la phase de sénescence. L'exposition à l'ozone, en

réduisant de manière précoce ces mêmes paramètres, pourrait provoquer le déclenchement anticipé des mécanismes amenant à l'abscission des feuilles, comme le montre le taux d'abscission foliaire supérieur des arbres traités. De façon générale, la réponse à l'ozone ressemble en de nombreux points à la sénescence naturelle : réduction de la photosynthèse, dégradation des chlorophylles et des protéines chloroplastiques, émission d'éthylène et abscission foliaire (Pell *et al.* 1997). De plus, l'ozone induit l'expression de plusieurs gènes spécifiques de la sénescence (*senescence-associated genes* SAG, Miller *et al.* 1999) et, comme celle-ci, stimule les activités RNase et nucléase (Booker 2004). On trouve à ce propos un SAG (UBQ10) parmi les EST surexprimées sous ozone (annexe 2).

II.4. Réponses cellulaires et métaboliques à l'exposition à l'ozone

II.4.1. Réponse stomatique

Les FJ des arbres exposés à l'ozone présentent entre 7 et 21 jours une fermeture stomatique significative (figure 41.C). Il est généralement admis que la réduction de la conductance stomatique en réponse au polluant n'est pas une cause de l'atteinte de la photosynthèse mais plutôt un de ses effets secondaires, *via* l'augmentation de la concentration interne en CO_2 qui entraîne la fermeture partielle des stomates (Fiscus *et al.* 1997). La diminution de la conductance stomatique observée pour les FJ intervient pourtant sans que l'assimilation ne soit touchée, ce qui suggère un effet direct de l'ozone sur les stomates. Le polluant pourrait affecter les cellules de garde en induisant la formation de peroxyde d'hydrogène, capable d'agir sur les canaux calciques membranaires (Fiscus *et al.* 2005). Ce type de réponse stomatique pourrait par ailleurs permettre de protéger les tissus foliaires en limitant le flux entrant d'ozone (*stratégie d'évitement*).

L'absence de variation de la conductance stomatique en réponse à l'ozone dans les feuilles pleinement développées (FJ à partir de 21 jours et FM) montre que les feuilles à ce stade de développement ne sont pas capables de limiter le flux entrant d'ozone. En raison de la diminution de la photosynthèse, la concentration interne en CO_2 croissante aurait pu provoquer une fermeture stomatique (Noormets *et al.* 2001). L'absence de fermeture stomatique en réponse à l'ozone traduit peut-être ici une perturbation du contrôle stomatique. Ce type d'effets de l'ozone sur les stomates (défaut de contrôle stomatique, fermeture incomplète) a été rapporté pour le peuplier (Reich & Lassoie 1985) et le chêne (Grulke *et al.* 2005).

II.4.2. Stimulation des processus cataboliques

L'exposition à l'ozone a provoqué une augmentation de la respiration mitochondriale de jour (R_d) et de nuit (R_n) des FJ (figure 47). Cette stimulation est surtout marquée à 20 jours de traitement. Dans les FM, R_n est également stimulée à 20 jours, mais R_d ne varie ni en fonction du temps, ni en réponse à l'ozone. On remarque par ailleurs que, pour un même échantillon de feuilles, les valeurs de R_n sont à peine supérieures à celles de R_d (figure 47). On estime généralement que la respiration mitochondriale est plus faible à la lumière qu'à l'obscurité, mais le degré de cette inhibition peut varier de 0 à 75 % selon les études (Krömer 1995). Dans nos conditions expérimentales, une inhibition presque nulle de la respiration mitochondriale est observée dans les feuilles illuminées. La stimulation de la respiration mitochondriale foliaire en réponse à une exposition chronique à l'ozone a été mesurée chez le peuplier, le bouleau, l'épicéa, le pin sylvestre (Dizengremel 2001) et l'érable à sucre (Tjoelker *et al.* 1995). Cette augmentation du dégagement de CO_2 lié aux dégradations oxydatives mitochondriales est accompagnée par la stimulation de l'activité d'enzymes associées aux processus cataboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphate et cycle de Krebs) (Dizengremel *et al.* 1994, Sehmer *et al.* 1998). Parmi ces enzymes, la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc) se montre particulièrement sensible à l'ozone puisque son activité est stimulée deux à cinq fois selon les espèces (Dizengremel 2001). L'augmentation de l'expression et de la quantité de la PEPc a de plus été mesurée chez le pin (Fontaine *et al.* 2003). Dans notre étude, l'activité PEPc est stimulée à partir de 14 jours par un facteur trois pour les FJ et par un facteur deux pour les FM (figure 45.B). L'activation du catabolisme en réponse à l'ozone pourrait témoigner d'une demande accrue en énergie et en pouvoir réducteur pour le métabolisme secondaire et les processus de détoxication et de réparation (Pell *et al.* 1997, Saxe 2002). Les études protéomique (Annexe 1) et transcriptomique (Annexe 2) apportent des éléments appuyant cette hypothèse. Parmi les protéines surexprimées dans les FJ traitées, on trouve ainsi une enzyme de la glycolyse (phosphoglucomutase), du cycle de Krebs (malate déshydrogénase) et une isoforme cytosolique de l'ascorbate peroxydase (APX 2) (Annexe 1, tableau 1). Une autre isoforme cytosolique de cette enzyme (APX 1b) fait en outre partie des séquences surexprimées dans les feuilles matures traitées (Annexe 2, tableau A2.1).

II.4.3. Conséquences métaboliques de la stimulation de la PEPc

Lors d'une exposition à l'ozone, la stimulation de la PEPc pourrait permettre de maintenir l'alimentation du cycle de Krebs malgré la baisse de la photosynthèse (Tietz & Wild 1991). Le fait que cette stimulation intervienne dans les FM sans modification de R_d suggère que la PEPc pourrait jouer un autre rôle. À partir de la formation d'acide oxaloacétique (AOA) par la PEPc, la

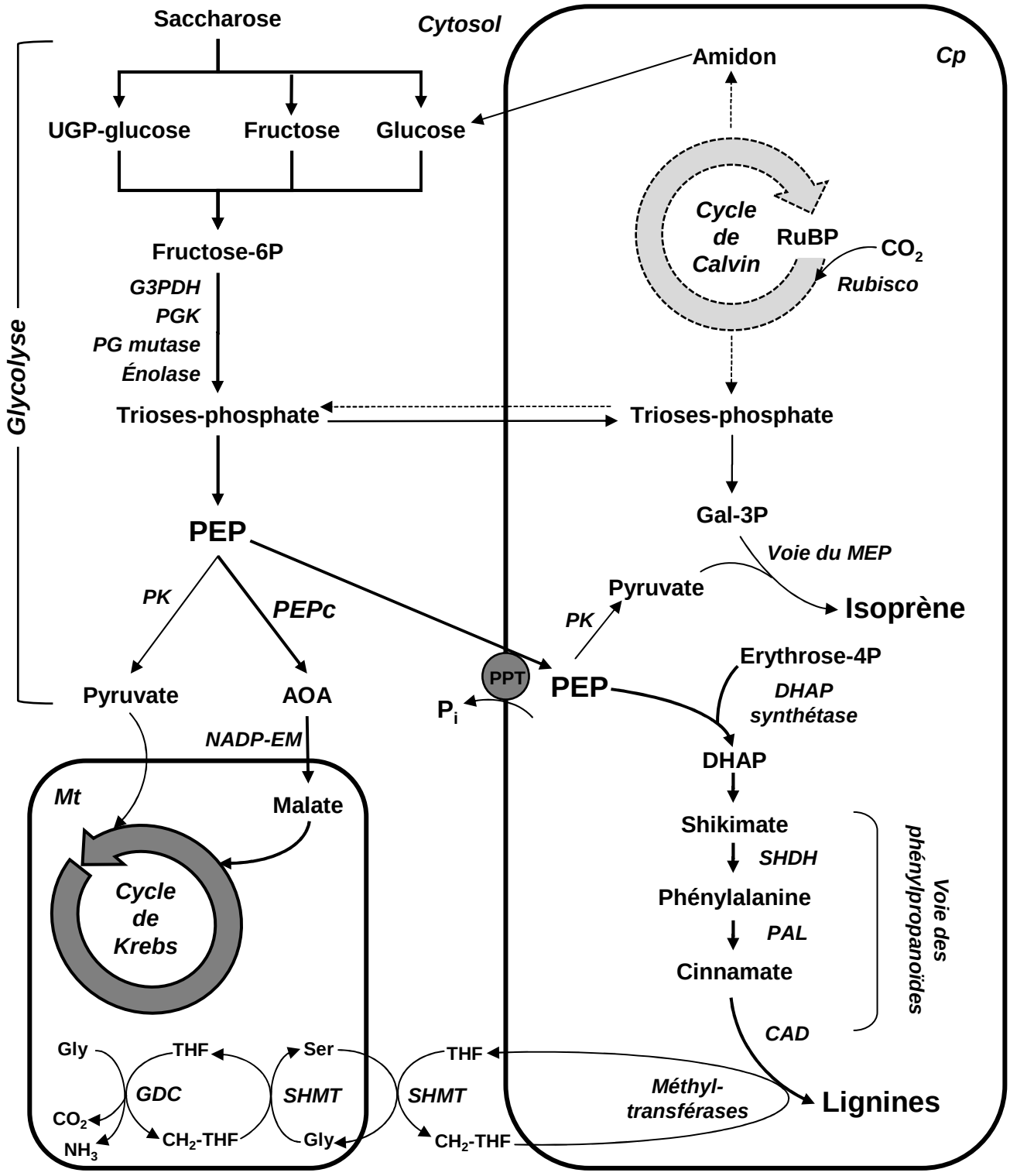


Figure 56 : Hypothèses de modification du métabolisme carboné induite par l'ozone dans une cellule mésophyllienne mature : origine et utilisation du PEP.

Abréviations : AOA acide oxaloacétique, CAD cinnamyl alcool déshydrogénase, Cp chloroplaste, DHAP dihydroacétone-phosphate, G3PDH glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Gal-3P glycéraldéhyde-3-phosphate, GDC glycine décarboxylase, MEP méthylérythritol 4-phosphate, Mt mitochondrie, NADP-EM enzyme malique NADP-dépendante, PAL phénylalanine amino lyase, PEP phosphoénolpyruvate, PEPc phosphoénolpyruvate carboxylase, PG phosphoglycérate kinase, PK pyruvate kinase, PPT transporteur PEP : phosphate, RuBP ribulose-1,5-bisphosphate, SHDH shikimate déshydrogénase, SHMT sérine hydroxyméthyltransférase, THF tétrahydrofolate.

conversion du malate en pyruvate par l'enzyme malique NADP-dépendante peut amener à la formation dans le cytosol de pouvoir réducteur sous la forme de NADPH. Le malate lui-même, *via* la navette malate/AOA, peut être importé dans divers compartiments cellulaires pour fournir du pouvoir réducteur. Ces mécanismes, qui interviennent en aval de l'activité PEPc, pourraient contribuer à alimenter les processus de détoxication dans divers compartiments cellulaires (Dizengremel 2001). La stimulation de la PEPc pourrait également participer à l'activation de la voie anaplérotique soutenant la synthèse d'acides aminés (Chollet *et al.* 1996), notamment par l'export de citrate hors de la mitochondrie (figure 59). La conversion du citrate dérouté du cycle de Krebs en isocitrate par l'isocitrate déshydrogénase cytosolique est accompagnée d'une formation de NADPH qui pourrait renforcer le pouvoir réducteur du cytosol. L'isocitrate formé est ensuite converti en 2-oxoglutarate (2OG) qui est ensuite pris en charge par la GS chloroplastique, ou éventuellement par la GS cytosolique (figure 59).

Le substrat de la PEPc, le phosphoénolpyruvate (PEP), possède un rôle central au carrefour des voies métaboliques primaires et secondaires (figure 56). Le PEP est en effet à la base des voies de biosynthèse de l'isoprène et des phénylpropanoïdes dans le chloroplaste. L'isoprène est un COV émis en abondance par la plupart des espèces de peuplier (Loreto & Fares 2007). Chez *P. deltoides*, Rosenstiel *et al.* (2003) ont proposé que la synthèse d'isoprène et l'activité PEPc entraient en compétition pour leur substrat commun, le PEP. Loreto *et al.* (2007) ont confirmé cette hypothèse en montrant une corrélation négative entre l'émission d'isoprène et l'activité PEPc dans des feuilles matures de *P. alba*. Les travaux de ce groupe ont par ailleurs mis en avant le rôle bénéfique de l'isoprène dans la résistance du peuplier à l'ozone (Loreto & Fares 2007). La protection des tissus foliaires par l'émission d'isoprène viendrait de sa capacité à éliminer une partie de l'ozone avant même qu'il n'entre en contact avec les cellules (Loreto *et al.* 2001). Outre la synthèse de l'isoprène, le PEP participe à la voie des phénylpropanoïdes dans le chloroplaste, qui mène notamment à la synthèse des lignines. Dans des conditions expérimentales identiques à celles appliquées dans notre étude et pour le même modèle biologique (*P. tremula x alba*), Cabané *et al.* (2004) ont mis en évidence dans les feuilles des arbres traités une stimulation de l'activité spécifique de trois enzymes de la voie de synthèse des lignines - shikimate déshydrogénase, phénylalanine ammonialyase et cinnamyl alcool déshydrogénase - associée à une augmentation des transcrits de cette dernière enzyme. L'activation de la voie des phénylpropanoïdes s'est accompagnée d'une augmentation de la teneur et de la densité des lignines, qui a été interprétée comme un mécanisme potentiel de protection contre l'ozone par le renforcement de la barrière formée par la paroi cellulaire (Cabané *et al.* 2004).

Par conséquent, la réponse métabolique à l'exposition à l'ozone met en jeu trois voies métaboliques dont le PEP est un substrat commun. Ces voies sont (i) la voie anaplérotique d'approvisionnement du cycle de Krebs *via* l'activité de la PEPc, (ii) la voie de synthèse de

l'isoprène et (iii) la voie des phénylpropanoïdes à l'origine des lignines. Cette situation implique une demande croissante en PEP, qui pourrait justifier la stimulation par l'ozone de la voie glycolytique en amont de la PEPc (Dizengremel 1994, Sehmer 1998). Dans le contexte de notre étude, le problème de la demande en PEP se pose de manière particulièrement forte pour les feuilles en développement au moment où elles atteignent leur pleine expansion. En conditions normales, la période suivant la fin de l'expansion foliaire est marquée par un dépôt de lignine au niveau de la paroi cellulaire (Coleman 1986). De plus, le taux d'émission d'isoprène des feuilles matures de *P. alba* est supérieur à celui des feuilles jeunes (Loreto *et al.* 2007) et l'on observe dans les FJ témoins une augmentation légère mais significative de l'activité de la PEPc avec le temps (figure 47). À ces augmentations inhérentes au développement foliaire s'ajoute, dans nos conditions d'exposition à l'ozone, la stimulation importante de l'activité PEPc et de la voie des phénylpropanoïdes. En réponse à l'ozone, les feuilles en phase finale d'expansion sont confrontées d'une part à la diminution de leur capacité photosynthétique et d'autre part à une demande potentielle considérable en PEP pour répondre aux besoins combinés des trois voies métaboliques considérées (PEPc, lignines et isoprène).

Les effets de l'ozone mesurés à l'échelle de la feuille incluent une réduction importante de la capacité photosynthétique, expliquée en grande partie par l'atteinte des processus de fixation du CO_2, notamment au niveau de la rubisco, tandis que l'altération de la photochimie semble intervenir de manière plus tardive. La réduction de la photosynthèse s'accompagne d'une stimulation de la respiration mitochondriale et de l'activité de la PEPc. En provoquant simultanément une diminution du gain de carbone photosynthétique et une augmentation du catabolisme, l'ozone déséquilibre le budget carboné des cellules foliaires. Cette perturbation se traduit à l'échelle de la plante par une réduction de croissance, qui apparaît en fin de traitement. La sensibilité des tissus foliaires varie avec le stade de développement des feuilles. Les feuilles en phase précoce d'expansion se révèlent résistantes au polluant en termes de symptômes visibles et de photosynthèse. Pour ces feuilles, l'absence totale de modification du métabolisme carboné en réponse à l'ozone implique une capacité intrinsèque de résistance, pouvant provenir de la structure même de ces feuilles et/ou de l'activité métabolique intense qui les caractérise. À mesure que les feuilles en développement s'approchent de leur expansion maximale, leur sensibilité à l'ozone s'accroît. La transition entre le statut d'organe puits et celui d'organe source, qui représente une période clé du développement foliaire, semble constituer la période de sensibilité maximale à l'ozone. C'est seulement à partir de la transition puits/source que la toxicité de l'ozone se manifeste, notamment par l'apparition de symptômes visibles et la réduction de la capacité photosynthétique.

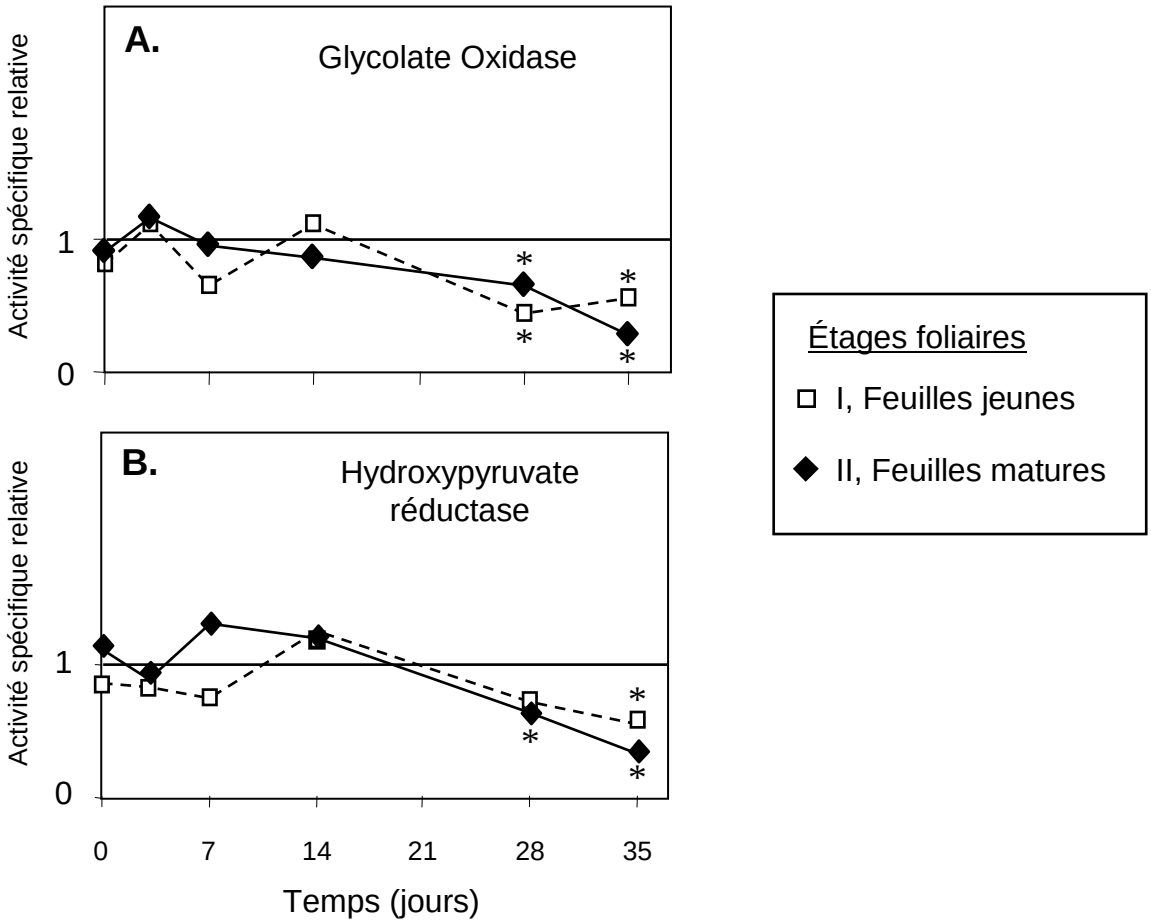


Figure 57 : Évolution au cours de la période de fumigation (100 ppb, 12 h par jour) de l'activité spécifique de **A**. la glycolate oxydase (GO) et **B**. l'hydroxypyruvate réductase (HPR) pour deux étages foliaires (I. feuilles jeunes : symboles ouverts et ligne pointillée ; II. feuilles matures, symboles pleins et ligne continue) de *Populus tremula x alba*. Les résultats représentent la valeur relative moyenne par rapport à la moyenne des témoins (n = 4). Les étoiles indiquent une différence significative entre arbres traités et arbres témoins (test t de Student ; $p < 0,05$).

Source : Rapport de DEA M. Bagard (2003)

III. Photorespiration

III.1. Activité photorespiratoire et enzymes associées

En réponse à l'ozone, l'activité photorespiratoire *in vivo* (P_r) est très fortement réduite dans les feuilles pleinement développées (FJ après 14 jours et FM) mais n'est pas modifiée dans les feuilles en expansion (FJ avant 14 jours et FE) (figure 48.A). La photorespiration apparaît évoluer avec le temps et en réponse à l'ozone en parallèle à la photosynthèse, avec toutefois un degré de réduction plus important. Le cycle de Calvin et celui de la photorespiration ont pour origine commune la prise en charge du RuBP par la rubisco. La mesure de l'activité carboxylase de la rubisco en conditions d'activation totale de l'enzyme apporte une estimation de la capacité totale de la rubisco. À ce titre, la réduction de l'activité rubisco enregistrée en réponse à l'ozone rend vraisemblablement compte d'une réduction de la capacité de l'enzyme à la fois pour la carboxylation et pour l'oxygénation du RuBP. Une telle réduction de l'activité photorespiratoire *in vivo* a été rapportée pour des plants de soja exposés pendant quatre mois à une concentration moyenne en ozone de 73 ppb à raison de 12 h par jour (Booker *et al.* 1997). Dans cette étude, l'évolution de l'activité photorespiratoire est également corrélée à celle de l'assimilation de CO_2, que ce soit en fonction du développement foliaire ou en réponse à l'ozone, et l'ampleur de la réduction est également plus importante pour la photorespiration que pour l'assimilation. En outre, la réduction de l'activité photorespiratoire est coordonnée à celle des activités enzymatiques de la glycolate oxydase (GO) et de l'hydroxypyruvate réductase (HPR). Une telle réduction coordonnée de l'activité de ces deux enzymes peroxysomales en réponse à l'ozone a aussi été montrée pour le pin d'alep (Dizengremel 2001). Dans notre étude, seule l'activité GO est affectée par l'ozone de la même manière que le taux de photorespiration *in vivo* (figure 48.B). L'activité HPR montre quant à elle des variations non significatives difficiles à interpréter dans le contexte d'une réduction de la photorespiration (figure 49.A). De plus, les variations de l'activité GO se rapprochent davantage de celles de l'activité rubisco que de celles de l'activité photorespiratoire, illustrant un écart possible entre capacité enzymatique *in vitro* et activités *in vivo*. Une étude antérieure portant sur la même espèce (*P. tremula x alba)* exposée à 100 ppb en ozone pendant 35 jours dans les mêmes conditions que celles de cette étude (cf. Annexe 2) a apporté des résultats plus cohérents, avec notamment une réduction coordonnée des activités GO et HPR dans les deux étages foliaires étudiés, correspondant aux FJ et aux FM (figure 57). En s'appuyant sur ces résultats et ceux publiés par Booker *et al.* (1997) et Dizengremel (2001), qui constituent d'ailleurs les seuls travaux recensés portant sur les effets de l'ozone sur la photorespiration, l'hypothèse la plus probable demeure celle d'une réduction coordonnée des activités photosynthétique et photorespiratoire en réponse au polluant.

L'absence de coordination entre les activités GO et HPR provient peut-être d'une régulation plus tardive de la HPR. Cette enzyme catalyse l'avant dernière étape du cycle de la photorespiration (figure 26) et pourrait, malgré la diminution de l'activité photorespiratoire, voir son activité se maintenir plus longtemps par l'apport d'hydroxypyruvate provenant d'autres voies métaboliques. La GO, qui intervient très tôt à la suite de l'oxygénation du RuBP (figure 26), serait plus fortement affectée par la réduction de la formation de glycolate-2P par la rubisco. Une inhibition par l'ozone plus tardive de l'activité HPR par rapport à celle de la GO est observée dans les trois études citées, ce qui tend à corroborer cette hypothèse.

La photorespiration peut être amenée à jouer un rôle de protection en conditions de saturation de la photochimie, lorsque l'ATP et le pouvoir réducteur produits ne peuvent être totalement utilisés et qu'apparaît un excès d'énergie d'excitation pouvant entraîner la formation de ROS (Heber *et al.* 1996). Dans de telles conditions, le cycle photorespiratoire permet de consommer l'énergie excédentaire et de protéger la cellule des effets néfastes de la photoinhibition et de la photooxydation (Kozaki & Takeba 1996, Wingler *et al.* 2000), notamment en cas de stress hydrique (Noctor *et al.* 2002). Comme le montre la baisse du rapport F_v/F_m en fin de traitement (figure 44.C), une saturation de la photochimie a pu survenir dans nos conditions expérimentales alors que les processus de fixation du CO_2 étaient fortement touchés. La diminution coordonnée de l'activité photorespiratoire empêche toutefois cette dernière de jouer un rôle de protection.

III.2. Réponse du couple GDC/SHMT et implications possibles

La quantité de la sous-unité H du complexe glycine décarboxylase (GDC H) et de la sérine hydroxyméthyl transférase (SHMT) augmente avec le développement des FJ et atteint sa valeur maximale à 21 jours, tandis qu'elle décline graduellement dans les FM qui se dirigent vers la sénescence (figure 51). Ces variations avec le développement foliaire sont comparables à celles décrites chez le pois par Vauclare *et al.* (1996). L'exposition à l'ozone n'a en revanche pas d'effet sur la teneur en GDC H et en SHMT, à l'exception d'une réduction accélérée dans les FM pour la SHMT. Le complexe mitochondrial GDC, qui représente 50 % des protéines de la matrice mitochondriale, catalyse la conversion de la glycine en 5,10-methylène tétrahydrofolate (CH2-THF) (Douce *et al.* 2001). Cette réaction, dont la sous-unité H constitue l'élément pivot, s'accompagne de la formation de CO_2, de NH_3 et de NADH (figure 58). Des études mettant en jeu des plantes mutées ou montrant une sous-expression de la GDC ont révélé que ce complexe multienzymatique était essentiel au métabolisme des plantes par sa contribution à deux voies métaboliques majeures : la photorespiration d'une part (Somerville & Ogren 1982) et le métabolisme des composés à un carbone (C1) d'autre part (Engel *et al.* 2007). Dans ces deux contextes, le fonctionnement de la GDC est couplé à celui de la SHMT, qui produit de la sérine exportée de la mitochondrie pour intégrer le cycle de la photorespiration (Douce & Neuburger

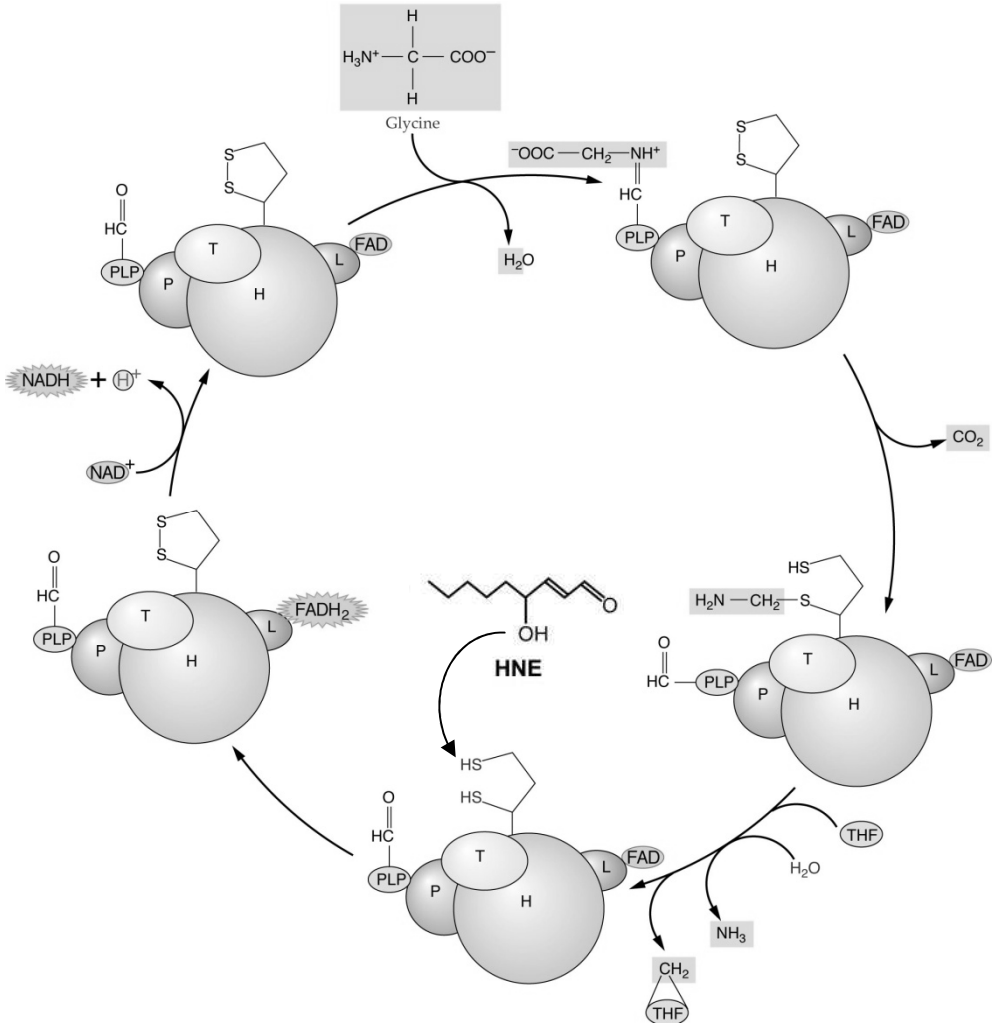


Figure 58 : Réactions catalysées par le complexe mitochondrial multienzymatique glycine décarboxylase (GDC) et action du HNE sur la fonction acide lipoïque de la sous-unité GDC H.

Sources : Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones Eds.
© 2000, American Society of Plant Physiologists
Taylor et al. (2002) *Journal of Biological Chemistry*, **277** (45) : 42663-42668.

1999). La sérine formée peut aussi servir de donneur de C1 dans différents compartiments cellulaires (figure 56) (Mouillon *et al.* 1999).

Dans notre système expérimental, la réduction de l'activité photorespiratoire dans les feuilles exposées à l'ozone n'est pas corrélée à la diminution de la teneur en GDC H et en SHMT. On peut émettre l'hypothèse que la stimulation du métabolisme C1 est suffisante pour compenser une moindre implication de ces enzymes dans le cycle photorespiratoire. Dans la mesure où la synthèse des lignines nécessite des quantités importantes d'intermédiaires C1 (Hanson & Roje 2001), la stimulation de la voie des phénylpronanoïdes et de la lignification rapportée par Cabané *et al.* (2004) pourrait expliquer une éventuelle activation du métabolisme C1 (figure 56). Une isoforme de la GDC H, phylogénétiquement distincte des isoformes connues, a été caractérisée dans le xylème du peuplier *P. tremuloides* (Wang *et al.* 2004). La présence de cette isoforme dans ce type de tissus a été reliée à la demande importante en intermédiaires C1 pour la lignification. En conditions normales, l'expression de cette isoforme spécifique du métabolisme C1 (H1) dans les tissus photosynthétiques de *P. tremuloides* est négligeable en comparaison à celle des deux isoformes associées à la photorespiration (H3 et H4) (Rajinikanth *et al.* 2007). En admettant que la technique d'immunodétection employée dans notre étude ne permette pas de distinguer les différentes isoformes de la GDC H, ce qui est probable, le maintien de la quantité de cette protéine pourrait traduire une inversion du rapport entre l'expression de l'isoforme H1 et celles des isoformes H3/4, inversion associée à la stimulation du métabolisme C1 et de la lignification en parallèle à la réduction de l'activité photorespiratoire en réponse à l'ozone.

Il demeure que la diminution accélérée du contenu en SHMT dans les FM traitées à l'ozone sans que celui en GDC H ne soit affecté est difficile à interpréter dans la mesure où les activités GDC/SHMT sont couplées, et que la SHMT joue aussi un rôle primordial à la base du métabolisme C1 (Hanson & Roje 2001). Des différences dans la sensibilité à l'ozone (dégradation) ou la régulation (expression) des deux enzymes peuvent être à l'origine de cette observation. L'exposition à l'ozone ayant provoqué le déclenchement précoce de la sénescence des FM, un comportement différent des deux enzymes au cours de la sénescence pourrait également expliquer le maintien de la quantité de la GDC H et le déclin accéléré de la SHMT.

La possibilité d'une régulation post-traductionnelle ne permet pas de relier avec certitude les variations de la quantité de GDC H et de SHMT aux variations de leur activité catalytique respective. L'activité GDC est notamment inhibée par le HNE (4-hydroxy-2-nonenal), un produit particulièrement réactif de la peroxydation lipidique (Taylor *et al.* 2004). Ce composé est ainsi capable d'inhiber, outre l'activité GDC, celle de plusieurs autres enzymes mitochondriales telles que la PDC, l'OGDC ou l'AOX (Millar & Leaver 2000, Winger *et al.* 2005). L'inhibition de l'activité GDC provient de la réaction du HNE avec une extension de la sous-unité H portant l'acide lipoïque essentiel à l'activité catalytique du complexe multienzymatique (figure 58) (Taylor *et al.*

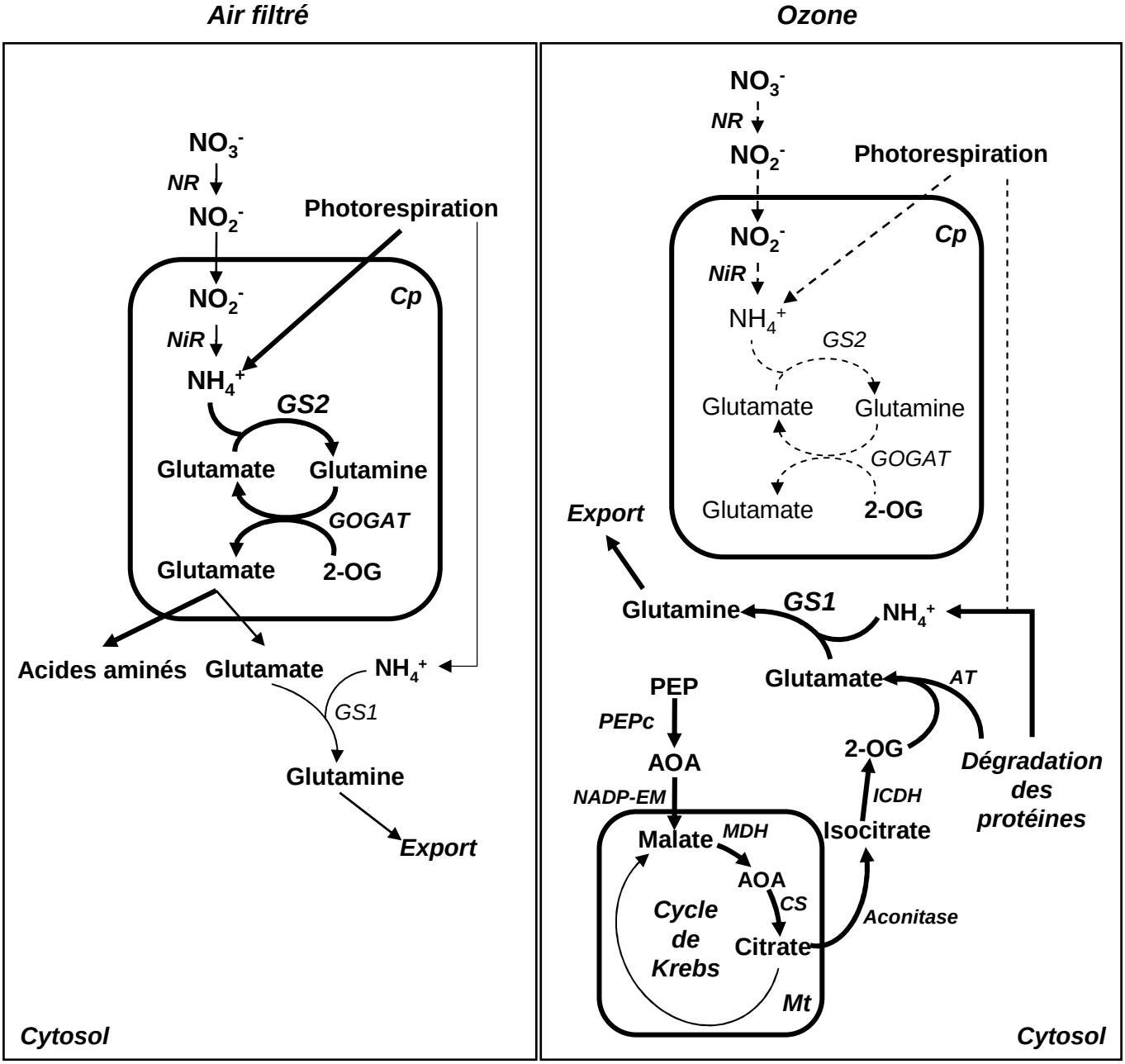


Figure 59 : Hypothèses de modification du métabolisme azoté primaire en réponse à l'ozone dans une cellule mésophyllienne mature : transition de l'assimilation (GS2) vers la remobilisation (GS1) et voie anaplérotique initiée par la PEPc.

Abréviations : 2-OG 2-oxoglutarate, AOA acide oxaloacétique, AT aminotransférases, Cp chloroplaste, CS citrate synthétase, GS glutamine synthétase, GOGAT glutamate synthétase, ICDH isocitrate déshydrogénase, MDH malate déshydrogénase, Mt mitochondrie, NADP-EM enzyme malique NADP-dépendante, PEP phosphoénolpyruvate, PEPc phosphoénolpyruvate carboxylase.

2002). L'exposition à l'ozone, comme toute contrainte environnementale induisant un stress oxydant, est susceptible de favoriser la formation du HNE qui pourrait inhiber l'activité GDC sans diminution de la quantité de la sous-unité H. Ce cas de figure remettrait alors en cause l'hypothèse du maintien de l'activité GDC en conditions de photorespiration réduite.

III.3. Réponse de la glutamine synthétase et implications possibles

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme clé du métabolisme azoté. Dans les tissus photosynthétiques des angiospermes, deux isoformes de la GS sont présentes. L'isoforme chloroplastique (GS2), la plus abondante, est surtout localisée dans les cellules photosynthétiques du mésophylle où elle assure l'assimilation primaire de l'ammonium et le recyclage de l'ammonium issu de la photorespiration (figure 59) (Lea & Miflin 2003). L'isoforme cytosolique (GS1) est surtout localisée dans le cytosol des cellules compagnes du phloème, suggérant un rôle dans la production de glutamine en tant que forme de transport de l'azote dans le phloème (Brugière *et al.* 1999). En conditions normales, la GS1 est présente dans le cytosol des cellules du mésophylle en faible abondance (Canton *et al.* 1999) mais peut être induite lors de la sénescence (Brugière *et al.* 2000) et en réponse à diverses contraintes biotiques et abiotiques (Bauer *et al.* 1997). Au niveau du métabolisme azoté, la sénescence est marquée par une transition de l'assimilation vers la remobilisation. Dans ce contexte, une stimulation importante de l'expression de la GS1 coordonnée à la répression de la GS2 a été montrée au cours de la sénescence foliaire (Masclaux *et al.* 2000). Une évolution similaire de l'expression des deux isoformes de la GS a été mesurée en cas de stress hydrique chez la tomate (Bauer *et al.* 1997). Enfin, Perez-Garcia *et al.* (1998) ont rapporté l'induction d'une isoforme cytosolique de la GS dans le mésophylle de plants de tomates infectés par *Pseudomonas syringae*. Les auteurs suggèrent que cette GS cytosolique serait impliquée dans la remobilisation de l'ammonium produit par la dégradation des chloroplastes.

Dans leur ensemble, ces études font apparaître que la GS1 pourrait être induite dans certaines circonstances (sénescence, stress hydrique, infection par un pathogène) où la nécessité d'une remobilisation rapide de l'azote intervient en même temps que la répression de la GS2 accompagnant l'altération de la machinerie chloroplastique. Les effets de l'exposition à l'ozone décrits précédemment (réduction de la teneur en chlorophylles, de la capacité photosynthétique et déclenchement précoce de la sénescence des feuilles matures) laissent penser que ces conditions sont précisément réunies dans le contexte de notre étude. L'activité GS totale n'est modifiée par l'ozone ni dans les FJ et FM avant 21 jours ni dans les FE à 35 jours (figure 49.B). Pour ces feuilles, la séparation éléctrophorétique en conditions natives des extraits protéiques totaux permet d'attribuer l'activité GS totale à un polypeptide d'une masse moléculaire de 400 kDa environ (figure 50), proche de celle de la GS2 de *P. tremula x alba* (418 kDa, Fu *et al.*

2003). Dans les feuilles pleinement développées des arbres traités, une stimulation significative de l'activité GS totale apparaît à partir de 21 jours. Cette stimulation s'accompagne de l'atténuation de la bande à 400 kDa et de l'apparition d'une bande de forte coloration à 600 kDa. En réponse à l'ozone, l'activité GS assurée par la GS2 semble donc diminuer dans les feuilles matures. En conditions normales, on estime que l'activité dédiée au recyclage de l'ammonium photorespiratoire représente une part très majoritaire de l'activité GS2 (figure 59). La forte réduction de l'activité photorespiratoire dans les feuilles matures traitées pourrait ainsi expliquer la baisse de l'activité GS2. Dans ces mêmes feuilles, l'activité GS totale affiche une stimulation importante en réponse à l'ozone. De plus, un peptide et deux EST correspondant à la GS1 figurent parmi les protéines (Annexe 1 tableau 1) et les transcrits (Annexe 2 tableau A2.1) surexprimées en réponse à l'ozone. Il est donc tentant d'attribuer la stimulation de l'activité GS totale par l'ozone à une induction de la GS1 cytosolique, à l'image des celle observée lors de la sénescence et en réponse au stress hydrique. Cependant, la bande colorée sur gel d'activité, qui semble rendre compte de l'augmentation de l'activité GS totale, correspond à une protéine de 600 kDa, contre seulement 320 kDa pour la GS1 de *P. tremula x alba* (Fu *et al.* 2003). Une dimérisation de la GS1 peut être envisagée, mais un tel mécanisme n'a pas été identifié pour cette enzyme.

Dans nos conditions expérimentales, l'activité photorespiratoire s'est avérée particulièrement affectée par l'exposition à l'ozone. Nos données indiquent que l'impact du polluant sur la photorespiration proviendrait en premier lieu de la réduction de la capacité enzymatique de la rubisco, qui est à l'origine de la fixation du CO_2 atmosphérique mais aussi du cycle photorespiratoire. À ce titre, la réduction de la photorespiration suivrait celle de la photosynthèse. Dans le contexte d'une réduction de la photorespiration, le maintien de la quantité de GDC H et de SHMT ainsi que la stimulation de l'activité GS totale ont permis de mettre en exergue l'implication potentielle de ces enzymes dans les voies métaboliques stimulées en réponse à l'ozone.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le travail présenté dans ce mémoire comportait deux objectifs principaux :

- améliorer la compréhension des effets de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire en relation au développement foliaire
- caractériser le comportement de la photorespiration en réponse à l'ozone.

La diversité des techniques utilisées a permis d'identifier un certain nombre de réponses moléculaires et cellulaires à l'exposition à l'ozone et de les relier à des effets mesurés à l'échelle de la feuille voire de la plante entière.

Les symptômes visibles (tâches nécrotiques, chlorose et abscission précoce) observés chez les arbres traités attestent en premier lieu de la sensibilité marquée de *P. tremula* x *alba* à une exposition chronique à l'ozone. Les arbres traités ont également montré une réduction de croissance qui s'est surtout manifestée au niveau de la croissance radiale de la tige et de la production de biomasse racinaire. Une telle réduction obtenue pour une durée de traitement de 35 jours seulement traduit en outre le niveau relativement élevé de l'exposition chronique appliquée dans notre étude. À l'échelle tissulaire, la confirmation du rôle prépondérant du peroxyde d'hydrogène dans l'initiation du phénomène de nécrose chez le peuplier offre une première perspective de travail. La démarche de localisation subcellulaire du peroxyde d'hydrogène et de mesure d'expression de gènes induits par ce composé adoptée par Pellinen *et al.* (1999, 2002) sur le bouleau pourrait être transposée à notre modèle biologique.

La diminution marquée de la capacité photosynthétique des arbres exposés à l'ozone explique sans doute en grande partie la perte de croissance enregistrée. L'impact négatif de l'ozone sur la photosynthèse a été apprécié aussi bien à l'échelle foliaire par des mesures d'échanges gazeux *in vivo* qu'à l'échelle cellulaire par des analyses biochimiques *in vitro*. Les données recueillies laissent apparaître que la restriction de la capacité photosynthétique provoquée par l'ozone résulte d'effets combinés sur les processus anaboliques (cycle de Calvin) et photochimiques (pigments, photosystèmes). À ce sujet, la séquence des évènements menant à la réduction de l'assimilation du CO_2 atmosphérique reste à établir, en précisant en particulier quels processus, de la fixation du CO_2 ou de la photochimie, sont affectés en premier lieu par l'ozone.

Une différence nette de sensibilité à l'ozone apparaît entre les feuilles pleinement développées et les feuilles en phase d'expansion. Les premières montrent ainsi systématiquement des

dommages visibles et une réduction de capacité photosynthétique tandis que les secondes ne sont affectées en aucune manière. La caractérisation de la capacité antioxydante dans les tissus foliaires à différents stades de développement pourrait apporter des éléments pour expliquer cette différence de sensibilité au polluant. Quelques composants clés du système antioxydant pourraient être ciblés, comme par exemple l'ascorbate, qui est souvent considéré comme la première ligne de défense contre l'ozone (Polle 1997). L'isoprène semble aussi présenter une capacité importante de protection contre le polluant (Loreto *et al.* 2001), en particulier pour une espèce fortement émettrice comme le peuplier (Loreto & Fares 2007). Cependant, les feuilles jeunes émettent moins d'isoprène que les feuilles matures, ce qui compromet l'intérêt de l'isoprène pour expliquer la résistance des feuilles jeunes. Plus généralement, le pouvoir réducteur cellulaire (NADH et NADPH), en tant que force motrice du système antioxydant, pourrait constituer un indicateur plus approprié de la capacité cellulaire de défense contre l'ozone (Dizengremel *et al.* sous presse). Les résultats préliminaires au niveau histologique laissent penser que l'importance des espaces intercellulaires au sein du mésophylle pourrait jouer un grand rôle dans la résistance des tissus foliaires en influant sur la diffusion de l'ozone dans les feuilles. Des analyses complémentaires prévues prochainement permettront de vérifier cette hypothèse par l'observation de coupes transversales de feuilles à différents stades de développement et exposées à l'ozone.

Pour les feuilles en développement, l'acquisition de la sensibilité semble coïncider avec la transition *puits*/*source*. La caractérisation de cette transition dans nos conditions expérimentales est nécessaire pour confirmer une telle observation. Le suivi de la concentration en saccharose et en sucres réducteurs au cours du développement foliaire pourrait permettre d'identifier le stade de développement correspondant à cette transition.

Outre une sensibilité prononcée à l'ozone en termes de symptômes visibles et de réduction de photosynthèse, les feuilles pleinement développées présentent en réponse à l'ozone une stimulation considérable de l'activité PEPc, qui semble constituer une réponse cellulaire spécifique à l'ozone, quelque soit le stade de développement des tissus foliaires au moment où ils sont exposés au polluant. Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'activité PEPc entre naturellement en compétition pour le substrat PEP avec les voies de synthèse de l'isoprène et des lignines. Cette situation est d'autant plus problématique lors d'une exposition à l'ozone que deux de ces trois voies métaboliques (PEPc et lignines) sont susceptibles d'être stimulées tandis que la troisième (isoprène) aboutit à la synthèse d'un COV pouvant éliminer l'ozone. Cette situation offre de nombreuses perspectives de recherche. On pourrait tout d'abord envisager d'évaluer, sous ozone, la part du PEP utilisée par chacune des voies en mesurant (i) l'activité PEPc, (ii) l'activité d'enzymes de la voies des phénylpropanoïdes (CAD, SDH, PAL) et (iii) le taux d'émission d'isoprène. En amont, la mesure d'activité d'enzymes glycolytiques pourrait répondre

à la question de l'origine du PEP. On pourrait également envisager de manipuler le niveau d'engagement des trois voies. La voie de biosynthèse de l'isoprène peut ainsi être inhibée chimiquement par un traitement à la fosmidomycine (Loreto & Fares 2007). Pour les lignines, des lignées de *P. tremula* x *alba* sous-exprimant la CAD ont été créées au centre INRA d'Orléans, mais le niveau d'inhibition de l'activité CAD foliaire est limité à 40 % (contre 90 % dans les tiges). Enfin, des lignées de peupliers surexprimant la PEPc sont en cours d'élaboration par l'équipe de H. Rennenberg de l'Université de Freiburg en Allemagne.

Concernant le deuxieme objectif de ce travail, nos résultats indiquent que l'activité photorespiratoire est fortement réduite dans les feuilles matures des arbres traités. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette réduction est celle d'une diminution coordonnée de la photosynthèse et de la photorespiration, ayant pour origine commune la réduction de la capacité rubisco que traduit la diminution de l'activité rubisco et de V_{cmax}. Au final, cette partie de notre étude s'est révélée porteuse d'informations de par le maintien, voire la stimulation, d'enzymes dont on aurait pu attendre une réponse à l'ozone parallèle à celle de l'activité photorespiratoire. Dans le cas de la GDC H, les travaux récents sur l'expression de ses isoformes dans les organes du peuplier *P. tremuloides* offrent des perspectives de recherche intéressantes à travers l'analyse de l'expression des gènes codant pour l'isoforme spécifique du métabolisme C1 (H1) et des isoformes associées à la photorespiration (H3 et H4) (Wang *et al.* 2004, Rajinikanth *et al.* 2007). De plus, l'inhibition potentielle de la GDC H par le HNE pourrait être vérifiée d'une part en mesurant la concentration en produits de la peroxydation lipidique et d'autre part en testant la formation du complexe acide lipoïque/HNE à l'aide d'anticorps spécifique de ce complexe, à l'image du travail de Winger *et al.* (2005) sur l'AOX.

Les résultats préliminaires concernant la réponse de la GS à l'ozone soulèvent un certain nombre d'interrogations, à commencer par la nature du peptide de 600 kDa induit par l'ozone. Les analyses protéomique et transcriptomique donnent cependant des indications concordantes puisque la GS1 est présente parmi les protéines et les ESTs surexprimées en réponse à l'ozone. Une analyse par immunoblot de la quantité des isoformes GS1 et GS2 est prévue prochainement et sera à terme complétée par la mesure par Q-RTPCR des niveaux de transcrits correspondants. La mesure d'expression par cette technique des EST différentiellement exprimées permettra de surcroît de confirmer les résultats de l'étude transcriptomique en vue de leur publication.

En conclusion, deux perspectives de recherche émergent en priorité du travail présenté dans ce mémoire. La première consiste en l'étude ciblée de l'expression des isoformes de la GS et de la GDC H en réponse à l'ozone. Une telle étude permettrait d'étendre notre champ d'investigation aux interconnections entre le métabolisme carboné primaire et ceux de l'azote et des C1. La deuxième perspective concerne la question de l'origine et de l'utilisation du PEP dans le contexte des modifications du métabolisme induites par l'ozone. Parmi les voies en compétition pour le PEP, la voie anaplérotique initiée par la PEPc, dont la stimulation constitue une caractéristique de la réponse à l'ozone, mérite un examen approfondi. En plus de ces deux perspectives majeures, cette étude a mis en évidence l'importance des changements physiologiques qui accompagnent le développement foliaire dans la sensibilité des tissus photosynthétiques à l'ozone.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES

Alscher, R. G., Erturk, N. & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53** (372): 1331-1341.

Arisi, A.-C. M., Cornic, G., Jouanin, L. & Foyer, C. H. (1998). Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO_2 partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. *Plant Physiology*, **117** (2): 565-574.

Ashmore, M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment*, **28** (8): 949-964.

Augspurger, C. K. & Bartlett, E. A. (2003). Differences in leaf phenology between juvenile and adult trees in a temperate deciduous forest. *Tree Physiology*, **23**: 517-525.

Baier, M., Kandlbinder, A., Golldack, D. & Dietz, K.-J. (2005). Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell & Environment*, **28** (8): 1012-1020.

Basha, M., Gross, K., Gwizdala, C., Haidar, A. & Popovich, J., Jr (1994). Bronchoalveolar lavage neutrophilia in asthmatic and healthy volunteers after controlled exposure to ozone and filtered purified air. *Chest*, **106** (6): 1757-1765.

Bauer, D., Biehler, K., Fock, H., Carrayol, E., Hirel, B., Migge, A. & Becker, T. W. (1997). A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress. *Physiologia Plantarum*, **99**: 241-248.

Bauerle, W. L., Weston, D. J., Bowden, J. D., Dudley, J. B. & Toler, J. E. (2004). Leaf absorptance of photosynthetically active radiation in relation to chlorophyll meter estimates among woody plant species. *Scientia Horticulturae*, **101** (1-2): 169-178.

Beedlow, P. A., Tingey, D. T., Phillips, D. L., Hogsett, W. E. & Olszyk, D. M. (2004). Rising atmospheric CO_2 and carbon sequestration in forests. *Frontiers in Ecology and the Environment*: 315-322.

Bernstein, J. A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I. L., Nel, A., Peden, D., Diaz-Sanchez, D., Tarlo, S. M. & Williams, P. B. (2004). Health effects of air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **114** (5): 1116-1123.

Bianco, R. & Hynes, J. T. (2006). Heterogeneous reactions important in atmospheric ozone depletion: a theoretical perspective. *Accounts of Chemical Research*, **39** (2): 159-165.

Black, V. J., Black, C. R., Roberts, J. A. & Stewart, C. A. (2000). Tansley Review No. 115. Impact of ozone on the reproductive development of plants. *New Phytologist*, **147** (3): 421-447.

Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J.-F., Dizengremel, P. & Renaut, J. (2007). A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics*, **7** (10): 1584-1599.

Booker, F. L. (2004). Influence of ozone on ribonuclease activity in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Physiologia Plantarum*, **120** (2): 249-255.

Booker, F. L., Reid, C. D., Brunschön-Harti, S., Fiscus, E. L. & Miller, J. E. (1997). Photosynthesis and photorespiration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. *Journal of Experimental Botany*, **48** (315): 1843-1852.

Bortier, K., Ceulemans, R. & De Temmerman, L. (2000a). Effects of ozone exposure on growth and photosynthesis of beech seedlings (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist*, **146** (2): 271-280.

Bortier, K., De Temmerman, L. & Ceulemans, R. (2000b). Effects of ozone exposure in open-top chambers on poplar (*Populus nigra*) and beech (*Fagus sylvatica*): a comparison. *Environmental Pollution*, **109** (3): 509-516.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.

Brendley, B. W. & Pell, E. J. (1998). Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiology*, **18**: 81-90.

Broadmeadow, M. S. J. & Jackson, S. B. (2000). Growth responses of *Quercus petraea*, *Fraxinus excelsior* and *Pinus sylvestris* to elevated carbon dioxide, ozone and water supply. *New Phytologist*, **146** (3): 437-451.

Brook, R. D., Brook, J. R., Urch, B., Vincent, R., Rajagopalan, S. & Silverman, F. (2002). Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation*, **105** (13): 1534-6.

Brugière, N., Dubois, F., Limami, A. M., Lelandais, M., Roux, Y., Sangwan, R. S. & Hirel, B. (1999). Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*, **11** (10): 1995-2012.

Brugière, N., Dubois, F., Masclaux, C., Sangwan, R. S. & Hirel, B. (2000). Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively to the mesophyll cytosol. *Planta*, **211**: 519-527.

Bussotti, F., Schaub, M., Cozzi, A., Gerosa, G., Novak, K. & Hug, C. (2006). Sources of errors in assessing ozone visible symptoms on native vegetation. *Environmental Pollution*, **140** (2): 257-268.

Cabané, M., Pireaux, J. C., Leger, E., Weber, E., Dizengremel, P., Pollet, B. & Lapierre, C. (2004). Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiology*, **134** (2): 586-94.

Cacace, F. & Speranza, M. (1994). Protonated ozone: experimental detection of O_3H^+ and evaluation of the proton affinity of ozone. *Science*, **265** (5169): 208-209.

Canton, F., Suarez, M.-F., José-Estanyol, M. & Canovas, F. (1999). Expression analysis of a cytosolic glutamine synthetase gene in cotyledons of Scots pine seedlings: developmental, light regulation and spatial distribution of specific transcripts. *Plant Molecular Biology*, **40** (4): 623-634.

Chameides, W. L., Kasibhatla, P. S., Yienger, J. & Levy, H., 2nd (1994). Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. *Science*, **264** (5155): 74-77.

Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** (10): 5818-5823.

Chapman, S. (1930). A theory of upper atmospheric ozone. *Memoirs of the Royal Meteorological Society*, **3**: 103–125.

Chollet, R., Vidal, J. & O'Leary, M. H. (1996). Phospho*enol*pyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 273-298.

Coleman, J. S. (1986). Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiology*, **2**: 289-299.

Coleman, M. D., Dickson, R. E., Isebrands, J. G. & Karnosky, D. F. (1995). Carbon allocation and partitioning in aspen clones varying in sensitivity to tropospheric ozone. *Tree Physiology*, **15**: 593-604.

Collins, W. J., Stevenson, D. S., Johnson, C. E. & Derwent, R. G. (1997). Tropospheric ozone in a global-scale three-dimensional lagrangian model and its response to NO_X emission controls. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **26** (3): 223-274.

COMEAP (1998). Committee on the medical effects of air pollutants, Quantifications of the effects of air pllution on health in the U.K.

Crous, K. Y., Vandermeiren, K. & Ceulemans, R. (2006). Physiological responses to cumulative ozone uptake in two white clover (*Trifolium repens* L. cv. Regal) clones with different ozone sensitivity. *Environmental and Experimental Botany*, **58** (1-3): 169-179.

Crutzen, P. J. (1970). The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Royal Meteorological Society Quaterly Journal*, **96**: 320–325.

Dalstein, L., Torti, X., Le Thiec, D. & Dizengremel, P. (2002). Physiological study of declining *Pinus cembra* (L.) trees in southern France. *Trees - Structure and Function*, **16** (4): 299-305.

Dambrine, E., Pollier, B., Poszwa, A., Ranger, J., Probst, A., Viville, D., Biron, P. & Granier, A. (1998). Evidence of current soil acidification in spruce stands in the Vosges mountains, north-eastern France. *Water, Air & Soil Pollution*, **105** (1): 43-52.

de Leeuw, F. A. A. M. (2000). Trends in ground level ozone concentrations in the European Union. *Environmental Science & Policy*, **3** (4): 189-199.

Dickson, R. E. & Larson, P. R. (1981). ^{14}C fixation, metabolic labeling patterns, and translocation profiles during leaf development in *Populus deltoides*. *Planta*, **152** (5): 461-470.

Dizengremel, P. (2001). Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39** (9): 729-742.

Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M. & Jolivet, Y. (sous presse). Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*, **sous presse**.

Dizengremel, P., Sasek, T. W., Brown, K. J. & Richardson, C. J. (1994). Ozone-induced changes in primary carbon metabolism enzymes of loblolly pine needles. *Journal of Plant Physiology*, **144**: 300-306.

Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. & Rébeillé, F. (2001). The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science*, **6** (4): 167-176.

Douce, R. & Neuburger, M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 214-222.

Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H. & De Paepe, R. (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell*, **15** (5): 1212-1226.

Eichelmann, H., Oja, V., Rasulov, B., Padu, E., Bichele, I., Pettai, H., Mols, T., Kasparova, I., Vapaavuori, E. & Laisk, A. (2004). Photosynthetic parameters of birch (*Betula pendula* Roth) leaves growing in normal and in CO_2- and O_3- enriched atmospheres. *Plant, Cell & Environment*, **27** (4): 479-495.

Emberson, L. D., Ashmore, M. R., Cambridge, H. M., Simpson, D. & Tuovinen, J. P. (2000a). Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution*, **109** (3): 403-13.

Emberson, L. D., Wieser, G. & Ashmore, M. R. (2000b). Modelling of stomatal conductance and ozone flux of Norway spruce: comparison with field data. *Environmental Pollution*, **109** (3): 393-402.

Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoglu, U., Morgenthal, K., Weckwerth, W., Parnik, T., Keerberg, O. & Bauwe, H. (2007). Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiology*, **144** (3): 1328-1335.

Enyedi, A. J., Eckardt, N. A. & Pell, E. J. (1992). Activity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from potato cultivars with differential response to ozone stress. *New Phytologist*, **122** (3): 493-500.

Fares, S., Barta, C., Brilli, F., Centritto, M., Ederli, L., Ferranti, F., Pasqualini, S., Reale, L., Tricoli, D. & Loreto, F. (2006). Impact of high ozone on isoprene emission, photosynthesis and histology of developing *Populus alba* leaves directly or indirectly exposed to the pollutant. *Physiologia Plantarum*, **128** (3): 456-465.

Farman, J. C., Gardiner, B. G. & Shanklin, J. D. (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature*, **315** (6016): 207-210.

Farquhar, G. D., Von Caemmerer, S. & Berry, J. A. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. *Planta*, **V149** (1): 78-90.

Felzer, B. S., Cronin, T., Reilly, J. M., Melillo, J. M. & Wang, X. (2007). Impacts of ozone on trees and crops. *Comptes Rendus Geosciences*, **339** (11-12): 784-798.

Fiscus, E. L., Booker, F. L. & Burkey, K. O. (2005). Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell & Environment*, **28** (8): 997-1011.

Fiscus, E. L., Reid, C. D., Miller, J. E. & Heagle, A. S. (1997). Elevated CO_2 reduces O_3-induced yield losses in soybeans: possible implications for elevated CO_2 studies. *Journal of Experimental Botany*, **48** (307): 307-313.

Flugge, U. I. (1998). Metabolite transporters in plastids. *Current Opinion in Plant Biology*, **1** (3): 201-6.

Fontaine, V., Cabane, M. & Dizengremel, P. (2003). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiologia Plantarum*, **117** (4): 445-452.

Fontaine, V., Pelloux, J., Podor, M., Afif, D., Gérant, D., Grieu, P. & Dizengremel, P. (1999). Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Physiologia Plantarum*, **105**: 187-192.

Fowler, D., Cape, J. N., Coyle, M., Flechard, C., Kuylenstierna, J., Hicks, K., Derwent, D., Johnson, C. & Stevenson, D. (1999a). The global exposure of forests to air pollutants. *Water, Air & Soil Pollution*, **116** (1): 5-32.

Fowler, D., Cape, J. N., Coyle, M., Smith, R. I., Hjellbrekke, A. G., Simpson, D., Derwent, R. G. & Johnson, C. E. (1999b). Modelling photochemical oxidant formation, transport, deposition and exposure of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, **100** (1-3): 43-55.

Foyer, C. H. & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, **17** (7): 1866-1875.

Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Pruvost, C. & Jouanin, L. (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology*, **109** (3): 1047-57.

Fryer, M. J., Andrews, J. R., Oxborough, K., Blowers, D. A. & Baker, N. R. (1998). Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport, and active O_2 metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology*, **116** (2): 571-580.

Fu, J., Sampalo, R., Gallardo, F., Canovas, F. M. & Kirby, E. G. (2003). Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. *Plant, Cell & Environment*, **26** (3): 411-418.

Fuhrer, J. (2003). Agroecosystem responses to combinations of elevated CO_2, ozone, and global climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **97** (1-3): 1-20.

Fuhrer, J. & Booker, F. (2003). Ecological issues related to ozone: agricultural issues. *Environment International*, **29**: 141-154.

Fuhrer, J., Skarby, L. & Ashmore, M. R. (1997). Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution*, **97** (1-2): 91-106.

Gallardo, F., Fu, J., Canton, F. R., Garcia-Gutiérrez, A., Canovas, F. M. & Kirby, E. G. (1999). Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta*, **210**: 19-26.

Gardner, S. D. L., Freer-Smith, P. H., Tucker, J. & Taylor, G. (2005). Elevated CO_2 protects poplar (Populus trichocarpa x P. deltoides) from damage induced by O_3: identification of mechanisms. *Functional Plant Biology*, **32** (3): 221-235.

Gaucher, C., Costanzo, N., Afif, D., Mauffette, Y., Chevrier, N. & Dizengremel, P. (2003). The impact of elevated ozone and carbon dioxide on young *Acer saccharum* seedlings. *Physiologia Plant*, **117** (3): 392-402.

Genty, B., Briantais, J. M. & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, **990**: 87-92.

Gérant, D., Podor, M., Grieu, P., Afif, D., Cornu, S., Morabito, D., Banvoy, J., Robin, C. & Dizengremel, P. (1996). Carbon metabolism enzyme activities and carbon partitioning in *Pinus halepensis* Mill. exposed to mild drought and ozone. *Journal of Plant Physiology*, **148**: 142-147.

Glaze, W. H. (1986). Reaction products of ozone: a review. *Environmental Health Perspectives*, **69**: 151–157.

Grace, J. (2004). Understanding and managing the global carbon cycle. *Journal of Ecology*, **92** (2): 189-202.

Grantz, D. A. (2003). Ozone impacts on cotton: towards an integrated mechanism. *Environmental Pollution*, **126** (3): 331-44.

Grantz, D. A. & Farrar, J. (1999). Acute exposure to ozone inhibits rapid carbon translocation from source leaves of Pima cotton. *Journal of Experimental Botany*, **50** (336): 1253-1262.

Grantz, D. A., Gunn, S. & Vu, H.-B. (2006). O_3 impacts on plant development: a meta-analysis of root/shoot allocation and growth. *Plant, Cell and Environment*, **29** (7): 1193-1209.

Greitner, C. S., Pell, E. J. & Winner, W. E. (1994). Analysis of aspen foliage exposed to multiple stresses: ozone, nitrogen deficiency and drought. *New Phytologist*, **127** (3): 579-589.

Grulke, N. E., Andersen, C. P., Fenn, M. E. & Miller, P. R. (1998). Ozone exposure and nitrogen deposition lowers root biomass of ponderosa pine in the San Bernardino Mountains, California. *Environmental Pollution*, **103** (1): 63-73.

Grulke, N. E., Dobrowolski, W., Mingus, P. & Fenn, M. E. (2005). California black oak response to nitrogen amendment at a high O3, nitrogen-saturated site. *Environmental Pollution*, **137** (3): 536-545.

Grulke, N. E. & Miller, P. R. (1994). Changes in gas exchange characteristics during the life span of giant sequoia: implications for response to current and future concentrations of atmospheric ozone. *Tree Physiology*, **14** (7_9): 659-668.

Grulke, N. E., Paoletti, E. & Heath, R. L. (2007). Comparison of calculated and measured foliar O_3 flux in crop and forest species. *Environmental Pollution*, **146** (3): 640-647.

Grünhage, L. & Jager, H.-J. (2003). From critical levels to critical loads for ozone: a discussion of a new experimental and modelling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution*, **125** (1): 99-110.

Guenther, A., Hewitt, N. C., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, N., McKay, W. A., Pierce, T., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J. & Zimmerman, P. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysycal Resarch*, **100** (5): 8873–8892.

Guicherit, R. & Roemer, M. (2000). Tropospheric ozone trends. *Chemosphere - Global Change Science*, **2** (2): 167-183.

Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Filippi, F. & Soldatini, G. F. (2001). Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environmental Pollution*, **113** (3): 245-54.

Haagen-Smit, A. J., Darley, E. F., Zaitlin, M., Hull, H. & Noble, W. (1952). Investigation on Injury to Plants from Air Pollution in the Los Angeles Area. *Plant Physiology*, **27** (1): 18-34.

Hanson, A. D. & Roje, S. (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 119-137.

Harley, P. C. & Tenhunen, J. D. (1991). Modeling the photosynthetic response of C3 leaves to environmental factors. Modeling crop photosynthesis - From biochemistry to canopy. Boote, K. J. & Loomis, R. S. Madison, USA, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. **19:** 17-39.

Hatzianastassiou, N., Katsoulis, B. & Antakis, B. (2007). Extreme Nitrogen Oxide and Ozone Concentrations in Athens Atmosphere in Relation to Meteorological Conditions. *Environmental Monitoring and Assessment*, **128** (1): 447-464.

Heagle, A. S. (1989). Ozone and Crop Yield. *Annual Review of Phytopathology*, **27** (1): 397-423.

Heber, U., Bligny, R., Streb, P. & Douce, R. (1996). Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. *Botanica Acta*, **109**: 307-315.

Heggestad, H. E. & Middleton, J. T. (1959). Ozone in High Concentrations as Cause of Tobacco Leaf Injury. *Science*, **129** (3343): 208-210.

Hermans, C., Deneys, V., Bergamaschi, E. & Bernard, A. (2005). Effects of ambient ozone on the procoagulant status and systemic inflammatory response. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3** (9): 2102-2103.

Hollosy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, **33** (2): 179-97.

Hormaza, J. I., Pinney, K. & Polito, V. S. (1996). Correlation in the tolerance to ozone between sporophytes and male gametophytes of several fruit and nut tree species (Rosaceae). *Sexual Plant Reproduction*, **9** (1): 44-48.

Howitz, K. T. & McCarty, R. E. (1991). Solubilization, partial purification, and reconstitution of the glycolate/glycerate transporter from chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiology*, **96** (4): 1060-1069.

Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Lea, P. J. & Gardestrom, P. (2001). The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiologia Plantarum*, **111** (4): 427-438.

Igamberdiev, A. U. & Lea, P. J. (2002). The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary of photosynthetic organisms. *Phytochemistry*, **60**: 651-674.

Ihorst, G., Frischer, T., Horak, F., Schumacher, M., Kopp, M., Forster, J., Mattes, J. & Kuehr, J. (2004). Long- and medium-term ozone effects on lung growth including a broad spectrum of exposure. *European Respiration Journal*, **23** (2): 292-299.

IPCC (2001). Intergovernmental Panel on Climate Change - Third Assessment Report.

IPCC (2007). Intergovernmental Panel on Climate Change - Fourth Assessment Report.

Jacob, J., Greitner, C. & Drake, B. G. (1995). Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and non-structural carbohydrate contents and in situ carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO_2 in the field. *Plant, Cell & Environment*, **18** (8): 875-884.

Jankowski, J. & Cader, A. B. (1997). The effect of depletion of the earth ozone layer on the human health condition. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, **10** (4): 349-64.

Jenkin, M. E. & Clemitshaw, K. C. (2000). Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric Environment*, **34** (16): 2499-2527.

Jetter, R., Riederer, M. & Lendzian, K. J. (1996). The effects of dry O_3, SO_2 and NO_2 on reconstituted epicuticular wax tubules. *New Phytologist*, **133** (2): 207-216.

Jordan, D. B. & Ogren, W. L. (1984). The CO_2/O_2 specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, **161** (4): 308-313.

Kangasjärvi, J., Jaspers, P. & Kollist, H. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment*, **28** (8): 1021-1036.

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R. (1994). Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment*, **17**: 783-794.

Karenlämpi, L. & Skarby, L. (1996). Critical levels for ozone in Europe: Testing and finalizing the concepts. UN-ECE Workshop Report.

Karlsson, P. E., Braun, S., Broadmeadow, M., Elvira, S., Emberson, L., Gimeno, B. S., Le Thiec, D., Novak, K., Oksanen, E., Schaub, M., Uddling, J. & Wilkinson, M. (2007). Risk assessments for forest trees: the performance of the ozone flux versus the AOT concepts. *Environmental Pollution*, **146** (3): 608-16.

Karlsson, P. E., Medin, E. L., Ottosson, S., Sellden, G., Wallin, G., Pleijel, H. & Skarby, L. (2004). A cumulative ozone uptake-response relationship for the growth of Norway spruce saplings. *Environmental Pollution*, **128** (3): 405-17.

Karnosky, D. F., Skelly, J. M., Percy, K. E. & Chappelka, A. H. (2007). Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environmental Pollution*, **147** (3): 489-506.

Karnosky, D. F., Zak, D. R., Pregitzer, K. S., Awmack, C. S., Bockheim, J. G., Dickson, R. E., Hendrey, G. R., Host, G. E., King, J. S., Kopper, B. J., Kruger, E. L., Kubiske, M. E., Lindroth, R. L., Mattson, W. J., Mcdonald, E. P., Noormets, A., Oksanen, E., Parsons, W. F. J., Percy, K. E., Podila, G. K., Riemenschneider, D. E., Sharma, P., Thakur, R., Sober, A., Sober, J., Jones, W. S., Anttonen, S., Vapaavuori, E. & Mankovska, B. (2003). Tropospheric O_3 moderates responses of temperate hardwood forests to elevated CO_2: a synthesis of molecular to ecosystem results from the Aspen FACE project. *Functional Ecology*, **17** (3): 289-304.

Keech, O., Pesquet, E., Ahad, A., Askne, A., Nordvall, D., Vodnala, S. M., Tuominen, H., Hurry, V., Dizengremel, P. & Gardestrom, P. (2007). The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment*, **30** (12): 1523-34.

Kerstiens, G. & Lendzian, K. J. (1989). Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytologist*, **112** (1): 13-19.

Kim, J. G., Yousef, A. E. & Khadre, M. A. (2003). Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in food and nutrition research*, **45**: 167-218.

Kinney, P. L. & Ozkaynak, H. (1991). Associations of daily mortality and air pollution in Los Angeles County. *Environmental Research*, **54** (2): 99-120.

Kleinfeld, M., Giel, C. & Tabershaw, I. R. (1957). Health hazards associated with inert gas shield metal arc welding. *American Medical Association Archives of Industrial Health*, **15**: 27-31.

Kozaki, A. & Takeba, G. (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*, **384** (6609): 557-560.

Krömer, S. (1995). Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**: 45-70.

Kronfuss, G., Polle, A., Tausz, M., Havranek, W. M. & Wieser, G. (1998). Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees - Structure and Function*, **12** (8): 482-489.

Kucera, V. & Fitz, S. (1995). Direct and indirect air pollution effects on materials including cultural monuments. *Water, Air & Soil Pollution*, **85** (1): 153-165.

Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H. (1989). Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology*, **90** (3): 1163-1167.

Landolt, W., Günthardt-Goerg, M., Pfenninger, I. & Scheidegger, C. (1994). Ozone-induced microscopical changes and quantitative carbohydrate contents of hybrid poplar (*Populus x euramericana*). *Trees*, **8**: 183-190.

Landolt, W., Gunthardt-Goerg, M. S., Pfenninger, I., Einig, W., Hampp, R., Maurer, S. & Matyssek, R. (1997). Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. *New Phytologist*, **137** (3): 389-397.

Langebartels, C., Ernst, D., Heller, W., Lütz, C., Payer, H.-D. & Sandermann, H. (1997). Ozone responses of trees: results from controlled chamber exposures at the GSF phytotron. Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments. Sandermann, H., Wellburn, A. R. & Heath, R. L. Berlin, Springer-Verlag**:** 163-200.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S. & Sandermann, H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40** (6-8): 567-575.

Langford, S. D., Bidani, A. & Postlethwait, E. M. (1995). Ozone-reactive absorption by pulmonary epithelial lining fluid constituents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **132** (1): 122-130.

Lea, P. J. & Miflin, B. J. (2003). Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41** (6-7): 555-564.

Lee, B.-S. & Wang, J.-L. (2006). Concentration variation of isoprene and its implications for peak ozone concentration. *Atmospheric Environment*, **40** (28): 5486-5495.

Lee, D. S., Holland, M. R. & Falla, N. (1996). The potential impact of ozone on materials in the U.K. *Atmospheric Environment*, **30** (7): 1053-1065.

Lee, D. S., Kohler, I., Grobler, E., Rohrer, F., Sausen, R., Gallardo-Klenner, L., Olivier, J. G. J., Dentener, F. J. & Bouwman, A. F. (1997). Estimations of global NOx emissions and their uncertainties. *Atmospheric Environment*, **31** (12): 1735-1749.

Leegood, R. C., Lea, P. J., Adcock, M. D. & Häusler, R. E. (1995). The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany*, **46** (Special issue): 1397-1414.

Lehnherr, B., Grandjean, A., Machler, F. & Fuhrer, J. (1987). The effect of ozone in ambient air on ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activity decreases photosynthesis and grain yield in wheat. *Journal of Plant Physiology*, **130**: 189–200.

Leitao, L., Bethenod, O. & Biolley, J.-P. (2007). The impact of ozone on juvenile maize (*Zea mays* L.) plant photosynthesis: effects on vegetative biomass, pigmentation, and carboxylases (PEPc and Rubisco). *Plant Biology*, **9** (4): 478-488.

Leitao, L., Dizengremel, P. & Biolley, J. P. (sous presse). Foliar CO_2 fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **in press**.

Leverenz, J. W., Paludan-Muller, G. & Saxe, H. (1999). Response to three seasons of elevated ozone in the progeny of healthy and unhealthy Norway spruce trees from a plantation with the 'top dying' syndrome. *New Phytologist*, **142** (2): 259-270.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79** (4): 583-593.

Loreto, F., Centritto, M., Barta, C., Calfapietra, C., Fares, S. & Monson, R. K. (2007). The relationship between isoprene emission rate and dark respiration rate in white poplar (*Populus alba* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment*, **30** (5): 662-669.

Loreto, F. & Fares, S. (2007). Is ozone flux inside leaves only a damage indicator? Clues from volatile isoprenoid studies. *Plant Physiology*, **143** (3): 1096-1100.

Loreto, F., Mannozzi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. & Pasqualini, S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology*, **126** (3): 993-1000.

Löw, M., Herbinger, K., Nunn, A., HÃ¤berle, K.-H., Leuchner, M., Heerdt, C., Werner, H., Wipfler, P., Pretzsch, H., Tausz, M. & Matyssek, R. (2006). Extraordinary drought of 2003 overrules ozone impact on adult beech trees (*Fagus sylvatica*). *Trees - Structure and Function*, **20** (5): 539-548.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

Lutz, C., Anegg, S., Gerant, D., Alaoui-Sosse, B., Gerard, J. & Dizengremel, P. (2000). Beech trees exposed to high CO_2 and to simulated summer ozone levels: Effects on photosynthesis, chloroplast components and leaf enzyme activity. *Physiologia Plantarum*, **109** (3): 252-259.

Magill, A. H., Aber, J. D., Berntson, G. M., McDowell, W. H., Nadelhoffer, K. J., Melillo, J. M. & Steudler, P. (2000). Long-term nitrogen additions and nitrogen saturation in two temperate forests. *Ecosystems*, **3** (3): 238-253.

Marenco, A., Gouget, H., Nédélec, P., Pagés, J.-P. & Karcher, F. (1994). Evidence of a long-term increase in tropospheric ozone from Pic du Midi data series - Consequences: Positive radiative forcing. *Journal of Geophysycal Resarch*, **99** (8): 16617-16632.

Martin, M. J., Host, G. E., Lenz, K. E. & Isebrands, J. G. (2001). Simulating the growth response of aspen to elevated ozone: a mechanistic approach to scaling a leaf-level model of ozone effects on photosynthesis to a complex canopy architecture. *Environmental Pollution*, **115**: 425-436.

Masclaux, C., Valadier, M.-H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J.-F. & Hirel, B. (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**: 510-518.

Massey, S. W. (1999). The effects of ozone and NOx on the deterioration of calcareous stone. *The Science of the Total Environment*, **227**: 109-121.

Matyssek, R., Gunthardt-Goerg, M. S., Keller, T. & Scheidegger, C. (1991). Impairment of gas exchange and structure in birch leaves (*Betula pendula*) caused by low ozone concentrations. *Trees - Structure and Function*, **5** (1): 5-13.

Matyssek, R., Keller, T. & Koike, T. (1993). Branch growth and leaf gas exchange of *Populus tremula* exposed to low ozone concentrations throughout two growing seasons. *Environmental Pollution*, **79** (1): 1-7.

Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P., Nunn, A. J. & Häberle, K.-H. (2006). Interactions between drought and O_3 stress in forest trees. *Plant Biology*, **1**: 11-17.

Maurer, S., Matyssek, R., Günthardt-Goerg, M., Landolt, W. & Einig, W. (1997). Nutrition and the ozone sensitivity of birch (Betula pendula) - I. Responses at the leaf level. *Trees - Structure and Function*, **12** (1): 1-10.

Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51** (345): 659-668.

McDonnell, W., Stewart, P., Smith, M., Pan, W. & Pan, J. (1999). Ozone-induced respiratory symptoms: exposure-response models and association with lung function. *European Respiration Journal*, **14** (4): 845-853.

Middleton, J. T., Kendrick, J. B. & Schwalm, H. W. (1950). Injury to herbaceous plants by smog or air pollution. *Plant Disease Reports*, **34**: 245-252.

Millar, A. H. & Leaver, C. J. (2000). The cytotoxicity lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *FEBS Letters*, **481**: 117-121.

Miller, F. J., Overton, J. H., Jaskot, R. H. & Menzel, D. B. (1985). A model of the regional uptake of gaseous pollutants in the lung : I. The sensitivity of the uptake of ozone in the human lung to lower respiratory tract secretions and exercise. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **79** (1): 11-27.

Miller, J. D., Arteca, R. N. & Pell, E. J. (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **120** (4): 1015-24.

Miller, P. R., de Lourdes de Bauer, M., Quevedo Nolasco, A. & Hernandez Tejeda, T. (1994). Comparison of ozone exposure characteristics in forested regions near Mexico City and Los Angeles. *Atmospheric Environment*, **28** (1): 141-148.

Moldau, H. & Bichele, I. (2002). Plasmalemma protection by the apoplast as assessed from above-zero ozone concentrations in leaf intercellular air spaces. *Planta*, **214** (3): 484-487.

Molina, M. J. & Rowland, F. S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, **249** (5460): 810-812.

Morgan, P. B., Ainsworth, E. A. & Long, S. P. (2003). How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment*, **26** (8): 1317-1328.

Mouillon, J. M., Aubert, S., Bourguignon, J., Gout, E., Douce, R. & Rebeille, F. (1999). Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant Journal*, **20** (2): 197-205.

Mudway, I. S. & Kelly, F. J. (2000). Ozone and the lung: a sensitive issue. *Molecular Aspects of Medicine*, **21** (1-2): 1-48.

Müller, C. & Riederer, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, **31** (11): 2621-2651.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, **15** (3): 473-497.

Nadelhoffer, K. J., Emmett, B. A., Gundersen, P., Kjonaas, O. J., Koopmans, C. J., Schleppi, P., Tietema, A. & Wright, R. F. (1999). Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. *Nature*, **398** (6723): 145-148.

Neufeld, H. S., Chappelka, A. H., Somers, G. L., Burkey, K. O., Davison, A. W. & Finkelstein, P. L. (2006). Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cutleaf coneflower. *Photosynthesis Research*, **87** (3): 281-6.

Niinemets, U. & Tenhunen, J. D. (1997). A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant, Cell & Environment*, **20** (7): 845-866.

Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**: 249-279.

Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. & Foyer, C. H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, **89** (7): 841-850.

Noormets, A., Sober, A., Pell, E. J., Dickson, R. E., Podila, G. K., Sober, J., Isebrands, J. G. & Karnosky, D. F. (2001). Stomatal and non-stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO_2 and/or O_3. *Plant, Cell & Environment*, **24** (3): 327-336.

NSF (2007). NSF Polar Programs UV Monitoring Network - UV Bulletin: Summary of the 2006 ozone hole season.

Nunn, A. J., Kozovits, A. R., Reiter, I. M., Heerdt, C., Leuchner, M., Lutz, C., Liu, X., Lo[diaeresis]w, M., Winkler, J. B., Grams, T. E. E., Haberle, K.-H., Werner, H., Fabian, P., Rennenberg, H. & Matyssek, R. (2005). Comparison of ozone uptake and sensitivity between a phytotron study with young beech and a field experiment with adult beech (*Fagus sylvatica*). *Environmental Pollution*, **137** (3): 494-506.

Ojenperä, K., Pätsikkä, E. & Yläranta, T. (1998). Effects of low ozone exposure of spring wheat on net CO_2 uptake, Rubisco, leaf senescence and grain filling. *New Phytologist*, **138**: 451-460.

Oksanen, E. & Holopainen, T. (2001). Responses of two birch (*Betula pendula* Roth) clones to different ozone profiles with similar AOT40 exposure. *Atmospheric Environment*, **35** (31): 5245-5254.

Oksanen, E., Riikonen, J., Kaakinen, S., Holopainen, T. & Vapaavuori, E. (2005). Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO_2 and ozone. *Global Change Biology*, **11** (5): 732-748.

Oksanen, E. & Rousi, M. (2001). Differences of Betula origins in ozone sensitivity based on open-field experiment over two growing seasons. *Canadian Journal of Forest Research*, **31** (5): 804-811.

Oliver, D. J. (1994). The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**: 323-337.

Oltmans, S. J., Lefohn, A. S., Harris, J. M., Galbally, I., Scheel, H. E., Bodeker, G., Brunke, E., Claude, H., Tarasick, D. & Johnson, B. J. (2006). Long-term changes in tropospheric ozone. *Atmospheric Environment*, **40** (17): 3156-3173.

Overmyer, K., Brosche, M. & Kangasjarvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*, **8** (7): 335-42.

Overmyer, K., Brosche, M., Pellinen, R., Kuittinen, T., Tuominen, H., Ahlfors, R., Keinanen, M., Saarma, M., Scheel, D. & Kangasjarvi, J. (2005). Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology*, **137** (3): 1092-104.

Pääkkönen, E., Holopainen, T. & Kärenlampi, L. (1997). Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth.) in revelation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution*, **96** (2): 117-127.

Paoletti, E. & Grulke, N. E. (2005). Does living in elevated CO_2 ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal responses. *Environmental Pollution*, **137** (3): 483-93.

Paoletti, E. & Manning, W. J. (2007). Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. *Environmental Pollution*, **150** (1): 85-95.

Paul, M. J. & Foyer, C. H. (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **52** (360): 1383-400.

Pearson, M. & Mansfield, T. A. (1993). Interacting effects of ozone and water stress on the stomatal resistance of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytologist*, **123** (2): 351-358.

Pell, E., Eckardt, N. & Glick, R. (1994a). Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthesis Research*, **39** (3): 453-462.

Pell, E. J., Eckardt, N. & Enyedi, A. J. (1992). Timing of ozone stress and resulting status of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist*, **120** (3): 397-405.

Pell, E. J., Landry, L. G., Eckardt, N. & Glick, R. E. (1994b). Air pollution and Rubisco: Effects and implications. Plant responses to the gaseous environment. Molecular, metabolic and physiological aspects. Alscher, R. G. & Wellburn, A. R. London, Chapman and Hall**:** 239-253.

Pell, E. J., Schlagnhaufer, C. D. & Arteca, R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, **100**: 264-273.

Pellinen, R., Palva, T. & Kangasjärvi, J. (1999). Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*, **20** (3): 349-356.

Pellinen, R. I., Korhonen, M.-S., Tauriainen, A. A., Palva, E. T. & Kangasjarvi, J. (2002). Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology*, **130** (2): 549-560.

Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J. & Dizengremel, P. (2001). Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant, Cell & Environment*, **24**: 123-131.

Perez-Garcia, A., Pereira, S., Pissarra, J., Gutierrez, A. G., Cazorla, F. M., Salema, R., deVicente, A. & Canovas, F. M. (1998). Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta*, **206** (3): 426-434.

Pleijel, H., Danielsson, H., Emberson, L., Ashmore, M. R. & Mills, G. (2007). Ozone risk assessment for agricultural crops in Europe: Further development of stomatal flux and flux-response relationships for European wheat and potato. *Atmospheric Environment*, **41** (14): 3022-3040.

Polle, A. (1997). Defense against photooxidative damage in plants. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defences. Scandalios, J., Cold Spring Harbor**:** 623-666.

Polle, A., Schwanz, P. & Rudolf, C. (2001). Developmental and seasonal changes of stress responsiveness in beech leaves (*Fagus sylvatica* L.). *Plant, Cell & Environment*, **24** (8): 821-829.

Polle, A., Wieser, G. & Havranek, W. M. (1995). Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst) at high altitude. *Plant, Cell & Environment*, **18** (6): 681-688.

Pryor, W. A. (1992). How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radic Biol Med*, **12** (1): 83-8.

Pryor, W. A. (1994). Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radical Biology and Medicine*, **5**: 451-465.

Pryor, W. A., Squadrito, G. L. & Friedman, M. (1995). The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radical Biology and Medicine*, **19** (6): 935-941.

Rajinikanth, M., Harding, S. A. & Tsai, C.-J. (2007). The glycine decarboxylase complex multienzyme family in Populus. *Journal of Experimental Botany*, **58** (7): 1761-1770.

Rao, M. V., Koch, J. R. & Davis, K. R. (2000). Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biololgy*, **44**: 345-358.

Rebbeck, J., Scherzer, A. & Loats, K. (2004). Foliar physiology of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) exposed to O_3 and elevated CO_2 over five seasons. *Trees - Structure and Function*, **18** (3): 253-263.

Reich, P. B. (1983). Effects of low concentrations of O_3 on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiology*, **73** (2): 291-296.

Reich, P. B. (1987). Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiology*, **3**: 63-91.

Reich, P. B. & Lassoie, J. P. (1985). Influence of low concentrations of ozone on growth, biomass partitioning and leaf senescence in young hybrid poplar plants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, **39** (1): 39-51.

Reilly, J., Paltsev, S., Felzer, B., Wang, X., Kicklighter, D., Melillo, J., Prinn, R., Sarofim, M., Sokolov, A. & Wang, C. (2007). Global economic effects of changes in crops, pasture, and forests due to changing climate, carbon dioxide, and ozone. *Energy Policy*, **35** (11): 5370-5383.

Ribas, A., Penuelas, J., Elvira, S. & Gimeno, B. S. (2005). Ozone exposure induces the activation of leaf senescence-related processes and morphological and growth changes in seedlings of Mediterranean tree species. *Environmental Pollution*, **134** (2): 291-300.

Richardson, A. D., Duigan, S. P. & Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, **153** (1): 185-194.

Rosenstiel, T. N., Potosnak, M. J., Griffin, K. L., Fall, R. & Monson, R. K. (2003). Increased CO_2 uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. *Nature*, **421** (6920): 256-9.

Roux, E., Ouedraogo, N., Hyvelin, J.-M., Savineau, J.-P. & Marthan, R. (2002). In vitro effect of air pollutants on human bronchi. *Cell Biology and Toxicology*, **18** (5): 289-299.

Rowland, F. S. (2006). Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences*, **361** (1469): 769-790.

Rubin, M. (2001). The history of ozone. The Schönbein period, 1839-1868. *Bulletin for the History of Chemistry*, **26** (1): 40-56.

Ruidavets, J. B., Cournot, M., Cassadou, S., Giroux, M., Meybeck, M. & Ferrieres, J. (2005). Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. *Circulation*, **111** (5): 563-9.

Runeckles, V. C. & Palmer, K. (1987). Pretreatment with nitrogen dioxide modifies plant response to ozone. *Atmospheric Environment*, **21** (3): 717-719.

Saxe, H. (2002). Physiological responses of trees to ozone - interactions and mechanisms. *Current Topics in Plant Biology*, **3**: 27-55.

Sehmer, L., Fontaine, V., Antoni, F. & Dizengremel, P. (1998). Effects of ozone and elevated carbon dioxide on carbohydrate metabolism of spruce needles. Catabolic and detoxification pathways. *Physiologia Plantarum*, **102**: 605-611.

Sharkey, T. D. & Yeh, S. (2001). Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 407-436.

Sharma, Y. K. & Davis, K. R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, **23** (3): 480-488.

Shavnin, S., Maurer, S., Matyssek, R., Bilger, W. & Scheidegger, C. (1999). The impact of ozone fumigation and fertilization on chlorophyll fluorescence of birch leaves (*Betula pendula*). *Trees - Structure and Function*, **14** (1): 10-16.

Sillman, S. (1999). The relation between ozone, NOx and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment*, **33** (12): 1821-1845.

Smirnoff, N. & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, **35** (4): 291-314.

Somerville, C. R. & Ogren, W. L. (1982). Mutants of the cruciferous plant Arabidopsis thaliana lacking glycine decarboxylase activity. *Biochemical Journal*, **202** (2): 373-80.

Stevenson, D. S., Johnson, C. E., Collins, W. J., Derwent, R. G., Shine, K. P. & Edwards, J. M. (1998). Evolution of tropospheric ozone radiative forcing. *Geophysical Research Letters*, **25** (20): 3819–3822.

Stockwell, W. R., Kramm, G., Scheel, H. E., Mohnen, V. A. & Seiler, W. (1997). Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments. Sandermann, H., Wellburn, A. & Heath, R. L. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **127:** 1-38.

Strohm, M., Eiblmeier, M., Langebartels, C., Jouanin, L., Polle, A., Sandermann, H. & Rennenberg, H. (1999). Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *Journal of Experimental Botany*, **50** (332): 365-374.

Strohm, M., Eiblmeier, M., Langebartels C., Jouanin, L., Polle A., Sandermann Jr, H. & Rennenberg, H. (2002). Responses of antioxidative systems to acute ozone stress in transgenic poplar (*Populus tremula x P. alba*) over-expressing glutathione synthetase or glutathione reductase. *Trees*, **16**: 262-273.

Takahashi, M., Nakagawa, M., Sakamoto, A., Ohsumi, C., Matsubara, T. & Morikawa, H. (2005). Atmospheric nitrogen dioxide gas is a plant vitalization signal to increase plant size and the contents of cell constituents. *New Phytologist*, **168** (1): 149-154.

Tausz, M., Grulke, N. E. & Wieser, G. (2007). Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution*, **147** (3): 525-531.

Taylor, G. (2002). *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a forest tree? *Annals of Botany*, **90**: 681-689.

Taylor, N. L., Day, D. A. & Millar, A. H. (2002). Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (45): 42663-42668.

Taylor, N. L., Day, D. A. & Millar, A. H. (2004). Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **55** (394): 1-10.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, **11** (6): 1187-1194.

Tietz, S. & Wild, A. (1991). Investigations on the phosphoenol pyruvate carboxylase activity of spruce needles relative to the occurence of novel forest decline. *Journal of Plant Physiology*, **137**: 327-331.

Tjoelker, M. G., Volin, J. C., Oleksyn, J. & Reich, P. B. (1995). Interaction of ozone pollution and light effects on photosynthesis in a forest canopy experiment. *Plant, Cell & Environment*, **18** (8): 895-905.

Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G. L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J. C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C. J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. & Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, **313** (5793): 1596-604.

Uddling, J., Gunthardt-Goerg, M. S., Matyssek, R., Oksanen, E., Pleijel, H., Sellden, G. & Karlsson, P. E. (2004). Biomass reduction of juvenile birch is more strongly related to stomatal uptake of ozone than to indices based on external exposure. *Atmospheric Environment*, **38** (28): 4709-4719.

Valentini, R., Epron, D., Angelis, P., Matteucci, G. & Dreyer, E. (1995). In situ estimation of net CO_2 assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment*, **18** (6): 631-640.

Vanhatalo, M., Huttunen, S. & Bäck, J. (2001). Effects of elevated [CO_2] and O_3 on stomatal and surface wax characteristics in leaves of pubescent birch grown under field conditions. *Trees - Structure and Function*, **15** (5): 304-313.

Vauclare, P., Diallo, N., Bourguignon, J., Macherel, D. & Douce, R. (1996). Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiology*, **112** (4): 1523-1530.

Vingarzan, R. (2004). A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*, **38** (21): 3431-3442.

Von Caemmerer, S. & Farquhar, G. D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, **153**: 376-387.

von Gunten, U. (2007). The basics of oxidants in water treatment. Part B: ozone reactions. *Water Science and Technology*, **55** (12): 25-29.

Wang, X. & Mauzerall, D. L. (2004). Characterizing distributions of surface ozone and its impact on grain production in China, Japan and South Korea: 1990 and 2020. *Atmospheric Environment*, **38** (26): 4383-4402.

Wang, Y., Jacob, D. J. & Logan, J. A. (1998). Global simulation tropospheric O_3-NO_x-hydrocarbon chemistry, 1. Model formulation. *Journal of Geophysical Research*, **103** (9): 10713-10725.

Wang, Y. S., Harding, S. A. & Tsai, C. J. (2004). Expression of a glycine decarboxylase complex H-protein in non-photosynthetic tissues of Populus tremuloides. *Biochimica Et Biophysica Acta Gene Structure and Expression*, **1676** (3): 266-272.

Weatherhead, E. C. & Andersen, S. B. (2006). The search for signs of recovery of the ozone layer. *Nature*, **441** (7089): 39-45.

Weber, S. U., Han, N. & Packer, L. (2001). Ozone: an emerging oxidative stressor to skin. *Current Problems in Dermatology*, **29**: 52-61.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**: 307-313.

Wieser, G., Hasler, R., Gotz, B., Koch, W. & Havranek, W. M. (2000). Role of climate, crown position, tree age and altitude in calculated ozone flux into needles of *Picea abies* and *Pinus cembra*: a synthesis. *Environmental Pollution*, **109** (3): 415-22.

Wieser, G. & Matyssek, R. (2007). Linking ozone uptake and defense towards a mechanistic risk assessment for forest trees. *New Phytologist*, **174** (1): 7-9.

Winger, A. M., Millar, A. H. & Day, D. A. (2005). Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *Biochemical Journal*, **387** (Pt 3): 865-70.

Wingler, A., Ann, V. J., Lea, P. J. & Leegood, R. C. (1999). Serine : glyoxylate aminotransferase exerts no control on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **50** (334): 719-722.

Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. & Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences*, **355**: 1517-1529.

Wittig, V. E., Ainsworth, E. A. & Long, S. P. (2007). To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant Cell Environ*, **30** (9): 1150-62.

WMO (2003). Scientific assessment of ozone depletion: 2002, Global research and monitoring project.

Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H.-J., Overmyer, K., Kangasjärvi, J., Sandermann, H. & Langebartels, C. (2002). Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 717-726.

Wolkoff, P., Nojgaard, J. K., Franck, C. & Skov, P. (2006). The modern office environment desiccates the eyes? *Indoor Air*, **16** (4): 258-65.

Woodbury, P. B., Laurence, J. A. & Hudler, G. W. (1994). Chronic ozone exposure alters the growth of leaves, stems and roots of hybrid *Populus*. *Environmental Pollution*, **85** (1): 103-108.

ANNEXES

ANNEXE 1

Analyse protéomique

A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism.

Bohler S., Bagard M., Oufir M., Planchon S., Hoffmann L., Jolivet Y., Hausman J.-F., Dizengremel P. & Renaut, J.

(**2007**) *Proteomics*, **7** (10): 1584-1599.

ANNEXE 2

Analyse transcriptionnelle

L'étude décrite dans cette annexe a consisté en une analyse à grande échelle du niveau des transcrits de feuilles matures de peupliers en réponse à une exposition chronique à l'ozone. L'expérience de fumigation en question a été réalisée en 2003 dans le cadre de mon travail de DEA. Ses caractéristiques sont très proches de celles des expériences détaillées dans la partie *Matériel & Méthodes* : exposition chronique en chambres de fumigation pendant 35 jours, même modèle biologique d'étude (*P. tremula x alba*) et suivi de feuilles matures et en développement. Seule la concentration en ozone appliquée diffère, avec 100 ppb contre 120 ppb. Pour une espèce sensible telle que le peuplier, ces deux niveaux d'exposition sont comparables. L'analyse transcriptionnelle en elle-même a été réalisée en 2003 sur la plate-forme technique de l'UPSC d'Umeå en Suède, mais la mise en service de la base de données en ligne UPSC BASE en 2005 a permis d'approfondir le traitement des données pendant la période de thèse et d'aboutir à des résultats s'inscrivant dans son contexte.

1. Principe de la technique

Les techniques mettant en œuvre des filtres d'ADN à haute densité (*microarrays*) permettent d'étudier l'effet d'un traitement sur l'expression de plusieurs milliers de gènes. Cette technique repose sur la fixation sur un support solide d'un très grand nombre de molécules d'ADN constituant la matrice pour des hybridations spécifiques. Pour notre étude, nous avons utilisé un filtre à ADNc de type POP1 issu de la collaboration entre le KTH de Stockholm et l'UPSC d'Umeå, en Suède. Son support physique est une lame de verre de 7,5 cm sur 2,5 cm, sur laquelle ont été déposées 13824 séquences nucléotidiques sondes. Ces ADN ont été sélectionnés à partir d'une banque d'EST composée de 33000 clones et répartis en sous-groupes selon le tissu ou l'organe dont ils proviennent. Le filtre formé des 13824 séquences sondes est présent en deux exemplaires sur chaque lame de verre, permettant une première réplication technique.

La méthode de mesure du niveau d'expression repose sur l'hybridation des ADN sondes composant le filtre avec des ADNc cibles marqués. Après l'extraction des ARN totaux à partir du matériel biologique étudié et une étape de transcription inverse, le marquage des ADNc cibles se fait ici par incorporation de deux fluorophores (Cy3-dNTP et Cy5-dNTP) de structure proche mais

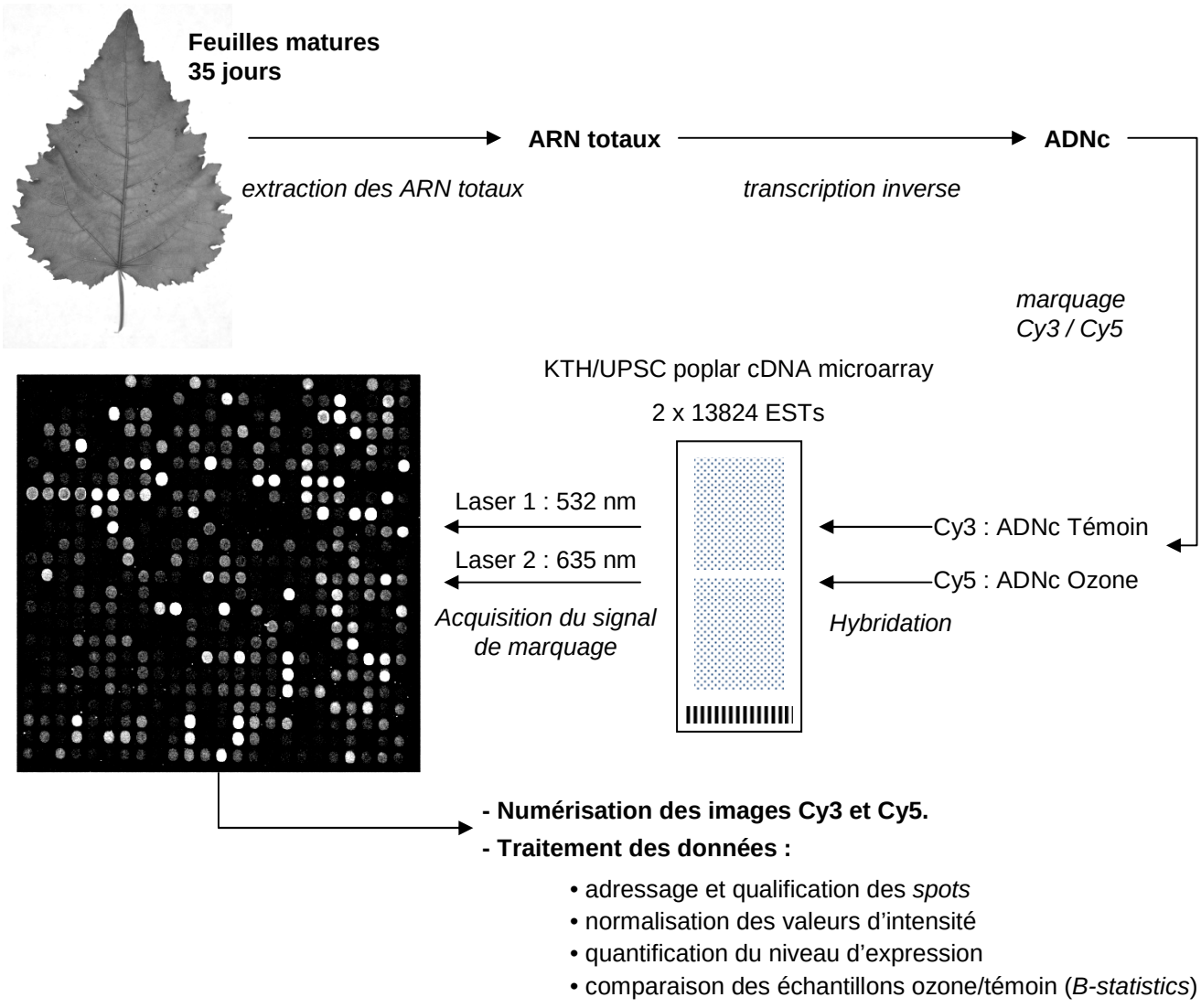


Figure A2.1. : Étapes successives de l'analyse transcriptionnelle.

dont les longueurs d'onde d'excitation diffèrent. Après le marquage des ADNc cibles et leur hybridation moléculaire aux ADN sondes, un scanner permet de quantifier l'intensité du marquage, qui est proportionnelle à la quantité de molécules d'ADNc cibles hybridées aux ADN sondes. Le marquage respectif de deux échantillons d'ADNc cibles avec ces deux fluorophores permet donc de quantifier sur une même lame et pour chaque EST les signaux d'hybridation associés à chacun des échantillons. Appliquée à deux échantillons appariés provenant d'un matériel biologique respectivement traité et non traité, la technique permet de mesurer l'impact d'un facteur (stress biotique ou abiotique, développement, sénescence, etc.) sur l'expression d'un grand nombre de gènes. Un traitement informatique permet de normaliser les données et de soustraire l'influence de la variabilité technique. Enfin, des analyses statistiques permettent d'identifier des variations significatives de l'abondance des transcrits.

2. Conditions de culture et de fumigation à l'ozone

L'analyse transcriptionnelle a porté sur des feuilles de peupliers juvéniles (*Populus tremula* Michx. x *Populus alba* L., clone INRA 717-1 B4) cultivés et exposés à l'ozone en chambres phytotroniques entre octobre 2002 et février 2003. Les arbres étudiés sont issus de boutures de tiges provenant du centre INRA d'Orléans. Les boutures ont été immergées dans une solution d'AIB à 4 $mg.mL^{-1}$ pour favoriser la néoformation de racines. Les tiges ont ensuite été plantées dans du sable fin largement irrigué. Après trois semaines, les tiges ont été rempotées dans des pots de 4 L dans un terreau de pépinière fertilisé (Gramoflor NFU 44-551), auquel ont été ajoutés 8 g de granulés nutritifs (Nutricote T100 NPK+MgO 13-13-13-2) par pot. Le drainage est assuré par une couche de 2 cm d'épaisseur de billes d'argile expansé disposées au fond des pots. Après dix semaines de culture, les plants ont été placés en chambres phytotroniques pour acclimatation pendant une semaine. Trente-quatre plants, d'une hauteur moyenne de 80 cm, ont ainsi été répartis dans quatre chambres de fumigation. Les conditions environnementales dans les chambres de culture et de fumigation sont identiques à celles présentées dans la section *Matériel & Méthodes*. Au terme de la semaine d'acclimatation, la moitié des arbres, répartis dans deux chambres de fumigation, a été exposée à un air enrichi en ozone tandis que le reste des arbres est maintenu en air filtré et forme le lot témoin. Les arbres traités ont été exposés à une concentration en ozone de 100 ± 15 ppb pendant les 12 heures quotidiennes de photopériode, sur une période de 35 jours. Le dispositif de fumigation est décrit dans la section *Matériel & Méthodes*.

Au début de la période de fumigation, deux étages foliaires ont été définis comme décrit précédemment. Le premier est constitué de feuilles déjà matures en début de traitement (FM). L'autre étage foliaire correspond à des feuilles jeunes (FJ) dont le développement se déroule

pendant la période de fumigation. L'analyse transcriptionnelle a porté sur des FM prélevées après 35 jours de traitement.

3. Préparation et hybridation des échantillons

3.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de feuilles matures (FM) prélevées après 35 jours d'expérience sur trois arbres en air filtré et trois arbres traités à l'ozone. Le protocole utilisé a été adapté de celui décrit par Chang *et al*. (1993). L'ensemble de la verrerie et des ustensiles utilisés est autoclavé. Les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure traitée au DEPC 0,1% et autoclavées. Environ un gramme de feuilles congelées est broyé dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est transvasée dans des tubes Falcon et dissoute dans 15mL de tampon d'extraction chaud (CTAB 2%, PVP K30 2%, TrisHCl pH 8 100mM, EDTA 25mM, NaCl 2M, β-mercaptoéthanol 2,67% v/v). Les échantillons sont laissés 5 minutes à 65°C puis subissent une extraction au CHISAM (chloroforme : isoamylalcool en proportion 24/1) : addition d'un volume de CHISAM suivie d'une centrifugation (15 minutes à 10000 rpm à température ambiante, appareil Beckman rotor JA-20), puis prélèvement de la phase aqueuse concentrant les ARN. L'extraction est répétée deux fois. Après l'ajout d'un quart de volume de LiCl 10M, les ARN précipitent pendant au moins 16 heures à 4°C.

A l'issue de l'étape de précipitation, les échantillons sont centrifugés 20 minutes à 10000 rpm à 4°C (Beckman, rotor JA20). Le culot est resuspendu dans 600 µL d'une solution de SSTE (NaCl 1 M, SDS 0,5 % m/v, Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM) à 60°C. Trois nouvelles étapes d'extraction au CHISAM sont réalisées, puis deux volumes d'éthanol froid 99,5% sont ajoutés. Après une période de précipitation d'au moins 12 heures à -20°C, les échantillons subissent une centrifugation de 20 minutes à 14000 g à 4°C. Le su rnageant est alors éliminé et remplacé par un volume d'éthanol à 70 %. Une nouvelle centrifugation et l'élimination du surnageant permet de dessaler les échantillons. Le culot est laissé sécher à l'air libre jusqu'à l'évaporation totale de l'éthanol résiduel, puis est resuspendu dans 100 µL d'eau DEPC.

La qualité des ARN extraits est évaluée sur gel d'agarose (agarose 1%, TAE, BET 2‰ v/v). De plus, une quantification spectrophotométrique est réalisée en mesurant l'absorbance à 260 nm spécifique des ARN. Le rapport de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm, associée aux protéines, permet d'évaluer la pureté des ARN totaux obtenus. Un rapport minimum de 2, correspondant à un niveau de pureté satisfaisant, a été obtenu pour l'ensemble des extraits.

3.2. Transcription inverse

Les ARN totaux des trois échantillons de chaque traitement sont mélangés de façon à ce que chaque échantillon apporte la même quantité d'ARN. La concentration finale en ARN totaux est de 2,5 $\mu g.\mu L^{-1}$.

Les ARN sont dénaturés pendant 5 minutes à 70°C, en présence d'oligo dT (aa-dUTP/dTTP en proportion 4:1). La transcription inverse a ensuite lieu pendant deux heures à 42°C. La composition du milieu réactionnel est la suivante : tampon RT (Gibco/Life Tech.), oligodT 10 mM, DTT 10 mM, inhibiteur de RNase (MBI Fermentas/ TAMRO) 3 % v/v, reverse transcriptase SuperScript II 6,66 $U.\mu L^{-1}$. La réaction est stoppée par l'ajout d'EDTA 125 mM, puis de NaOH 0,2 M. Après une incubation de 15 minutes à 65°C visant à éliminer les ARN résiduels, le milieu est neutralisé par l'ajout d'un volume d'Hepes pH 7 1 M. Les ADNc sont alors purifiés et dessalés à l'aide du kit MinElute Clean-up commercialisé par Qiagen.

3.3. Marquage et hybridation des ADNc

Les étapes suivantes nécessitent de protéger les échantillons de la lumière. Les molécules de marquage utilisées sont en effet très photosensibles. Les fluorophores Cy3 et Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech.) sont resuspendus dans 15 µL d'ADNc. Chaque fluorophore est assigné à une population d'ADNc. Le marquage s'effectue par incorporation des molécules Cy3 et Cy5 aux séquences d'ADN, au cours d'une incubation de deux heures à température ambiante à l'obscurité. Les ADNc marqués sont ensuite purifiés en utilisant le kit Qiaquick de purification de produits de PCR (Qiagen).

La lame est soumise à une étape de pré-hybridation pendant 45 minutes à 42°C. Le tampon utilisé a la composition suivante : SSC 5x, Formamide 50 % v/v, solution de Denhardt 5 % v/v, BSA 0,1 $\mu g.\mu L^{-1}$. La lame est recouverte d'un film protecteur (Hybrislip, Sigma-Aldrich) et placée dans une chambre d'hybridation adaptée. Après lavage à l'isopropanol 100 %, la lame reçoit un mélange des deux pools d'ADNc préalablement additionné au mélange d'hybridation (ARNt 0,3 $\mu g.\mu L^{-1}$, oligodA 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$, SSC 3x, Formamide 20 % v/v, SDS 0,5 % m/v) et dénaturé à 95°C pendant une minute. Un nouveau film est déposé, puis la lame est placée dans une chambre d'hybridation à 42°C, pendant au moins 16 heures. La lame hybridée subit ensuite trois lavages successifs par des solutions de lavage d'astringence décroissante (solution 1 : SSC 1x, SDS 0,03% m/v ; solution 2 : SSC 0,2x ; solution 3 : SSC 0,05x). Elle peut alors être conservée à l'obscurité pendant quelques semaines avant d'être analysée.

4. Acquisition et analyse des intensités de marquage

L'acquisition numérique des images associées aux deux marquages est réalisée à l'aide d'un scanner Packard Bioscience Scanarray 4000 et du logiciel qui lui est associé. Avant de numériser la lame en haute résolution (5 µm), un passage rapide à une résolution plus faible de 50 µm permet d'ajuster le focus, la puissance et le PMT (paramètre d'amplification par photomultiplication) des deux lasers, dans le but d'équilibrer l'intensité moyenne des deux images. Il est à noter que l'intensité de l'image obtenue à partir de Cy5 (635 nm) est systématiquement plus faible que pour Cy3 (532 nm), ce qui nécessite d'augmenter la puissance et le PMT du laser de 635 nm de longueur d'onde. Si l'augmentation de la puissance permet d'améliorer la détection, une forte valeur de PMT s'accompagne d'un bruit de fond important.

L'image est analysée à l'aide du logiciel GenePix. Les images provenant des deux fluorophores sont d'abord superposées. Les *spots* sont ensuite sélectionnés un à un au sein d'une grille composée de cercles de taille égale. Au cours du processus d'adressage, les cercles sont recentrés et leur taille est adaptée à celle des *spots*. L'étape suivante consiste à qualifier ces derniers (*flagging*) : les *spots* sont marqués comme bons, absents ou mauvais. Les « mauvais » *spots* sont généralement dus à la présence de poussières ou de sels résiduels. La valeur absolue de l'intensité de marquage pour chaque fluorophore est donnée par la valeur moyenne d'intensité dans le cercle entourant chaque « bon » *spot*. Chaque pixel peut présenter une valeur arbitraire d'intensité comprise entre 0 et 65356. On obtient finalement pour chaque *spot*, donc pour chaque EST, une valeur arbitraire d'intensité pour les deux marquages, associée à chacun des deux échantillons d'ADNc. Cette série de données est ensuite analysée grâce aux outils disponibles sur la base de données en ligne UPSC BASE (https://www.upscbase.db.umu.se/, Sjodin *et al*. 2006).

5. Traitement des données

La valeur d'intensité obtenue pour chaque *spot* est d'abord corrigée par soustraction du bruit de fond médian, puis l'ensemble des données est normalisé de façon à réduire le poids des erreurs systématiques et aléatoires non inhérentes à la variabilité du matériel biologique (*step-wise normalization*) (Smyth & Speed 2003). Les valeurs d'intensité sont ensuite filtrées pour ne conserver que les ESTs détectés sur l'ensemble des lames analysées. Notre étude a porté sur trois lames, analysées en parallèle. Pour l'une d'entre elles, le marquage des échantillons *ozone* et *témoin* avec les deux fluorophores Cy3 et Cy5 a été inversé (*dye swap*) de manière à annuler tout effet lié à d'éventuelles variations associées au marquage lui-même.

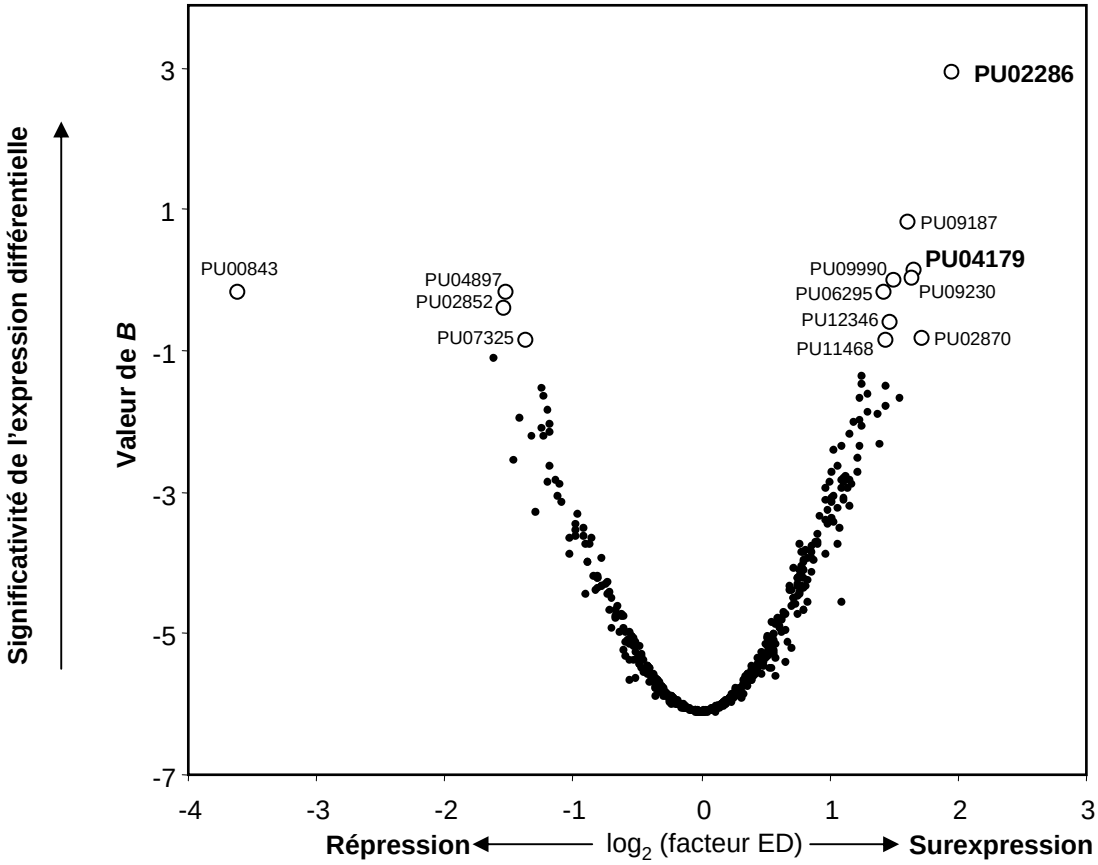


Figure A2.2. : Expression différentielle des 481 ESTs analysés dans les feuilles matures après 35 jours de fumigation (ozone 100 ppb).
En abscisse, le log de base 2 du rapport d'expression ozone/témoin rend compte de l'expression différentielle dans les échantillons issus des feuilles matures traitées. En ordonnée, la valeur de *B* indique le niveau de significativité de la différence d'expression observée. Les numéros d'accession des ESTs considérés comme différentiellement exprimés à α = 0,05 sont indiqués. En gras, les ESTs correspondant à la glutamine synthétase cytosolique (GS1).

Tableau A2.1. :
EST différentiellement exprimées dans les feuilles matures après 35 jours de fumigation (ozone 100 ppb). Les intitulés des EST correspondent à des abréviations des annotations provenant de la base de données UPSC BASE (www.upscbase.db.umu.se). Pour chaque EST, le facteur d'expression différentielle (ED) et les valeurs associées de *p* et de *B* sont indiqués.

	EST	Annotation	Facteur d'ED	*p*	*B*
Surexpression	PU02286	**Glutamine synthetase** (cytosolic isoform)	7,05	0,010	2,94
	PU02870	Putative prefoldin	5,61	0,048	-0,83
	PU04179	**Glutamine synthetase** (cytosolic isoform)	5,24	0,037	0,12
	PU09990	L-ascorbate peroxidase 1b (APX1b)	5,17	0,037	0,01
	PU09187	Ribosomal protein L1	5,02	0,037	0,80
	PU09230	Polyubiquitin (UBQ14)	4,53	0,037	-0,02
	PU12346	Polyubiquitin (UBQ10) (SEN3) SAG protein	4,35	0,046	-0,59
	PU11468	ATPase, plasma membrane-type	4,23	0,048	-0,87
	PU06295	RuBisCO small subunit 1A (RBCS-1A) (ATS1A)	4,18	0,037	-0,19
Répression	PU00843	Expressed protein (ABA- or cold-induced protein)	-36,69	0,037	-0,19
	PU02852	DNA-binding family protein / remorin family protein	-4,64	0,042	-0,40
	PU04897	Stress-responsive protein (similar to ethylene-inducible protein HEVER)	-4,59	0,037	-0,19
	PU07325	Photosystem I reaction center subunit psaK	-3,92	0,048	-0,87

Ces étapes ont permis d'aboutir aux valeurs d'intensité du marquage associé aux deux fluorophores pour 481 ESTs sur les 13824 présents sur la lame. C'est à partir de ces valeurs que sont identifiés les gènes différentiellement exprimés dans les échantillons *ozone* en comparaison aux témoins. Les ESTs analysés sont classés en terme d'expression différentielle en fonction de la valeur de *B* associée au test statistique du même nom (*B-statistics*, Smyth et al. 2003). Parmi les ESTs les mieux classés, ceux dont la valeur de *p* associée au test *t* modéré correspondant est inférieure à 0,05 sont considérés comme différentiellement exprimés (Smyth *et al.* 2003).

6. Identification des gènes différentiellement exprimés

L'expression différentielle des 481 ESTs analysés est illustrée sur la figure A2.2. En abscisse, on trouve le $\log_2$ du rapport entre l'intensité de marquage des échantillons provenant des feuilles traitées et celle des échantillo ns témoins. Le signe du $\log_2$ indique la nature de l'expression différentielle ($\log_2$ négatif = répression ; $\log_2$ positif = surexpression) tandis que sa valeur absolue rend compte de l'intensité de l'expression différentielle (plus la valeur absolue du $\log_2$ est élevée, plus forte est la répression ou la surexpression). En ordonnée, la valeur de *B* indique le niveau de significativité statistique des différences d'expression observées. Plus la valeur de *B* pour un EST est élevée, plus la probabilité que cet EST soit différentiellement exprimé dans l'échantillon *ozone* par rapport au témoin est grande. Les codes indiqués sur la figure correspondent aux numéros d'accession des ESTs considérés comme différentiellement exprimée au seuil de risque $\alpha = 0,5$. Les annotations de ces ESTs sont données dans le tableau A2.1. Parmi les ESTs potentiellement surexprimés, on note la présence de deux séquences exprimées (PU02286 et PU04179) correspondant au gène codant pour l'isoforme cytosolique de la glutamine synthétase (GS1) et surexprimés respectivement 5 et 7 fois. Parmi les autres ESTs significativement surexprimés, on trouve des séquences relatives à une ascorbate peroxydase (APX1), à la petite sous-unité de la rubisco, à deux ubiquitines (UBQ10 et UBQ14), à une protéine ribosomale, à une protéine chaperonne (*prefoldin*) et à une ATPase membranaire. Les ESTs réprimés correspondent à des gènes codant pour une sous-unité du photosystème I (*psaK*), une protéine dite de stress, un facteur de transcription potentiel et une protéine similaire à des protéines induites en réponse à l'ABA ou au froid. Cette dernière montre en réponse à l'ozone une expression 36 fois plus faible que dans les échantillons témoins.

Le nombre réduit de lames étudiées et la variabilité technique rencontrée ont limité le nombre d'ESTs pris en compte dans l'analyse et, par extension, celui des ESTs différentiellement exprimés. Ces contraintes ont en effet entraîné l'augmentation du seuil de significativité de l'expression différentielle des ESTs. Au final, seules des séquences dont l'expression a été modifiée par un facteur supérieur à quatre ont pu être retenues. Parmi ces

ESTs, on note la présence de deux séquences relatives au gène codant pour la GS1 et qui affichent une surexpression importante et statistiquement significative.

7. Références bibliographiques citées

Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11** (2): 113-116.

Sjodin, A., Bylesjo, M., Skogstrom, O., Eriksson, D., Nilsson, P., Ryden, P., Jansson, S. & Karlsson, J. (2006). UPSC-BASE -Populus transcriptomics online. *The Plant Journal*, **48** (5): 806-817.

Smyth, G. K. & Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, **31** (4): 265-73.

Smyth, G. K., Yang, Y. H. & Speed, T. (2003). Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods in Molecular Biology*, **224**: 111-36.

ANNEXE 3

Index des espèces végétales citées

Nom commun français	*Nom binominal*	Famille	Nom commun anglais
Arabette	*Arabidopsis thaliana*	Brassicacées	Rockress
Blé	*Genre Triticum L.*	Poacées	Wheat
Bouleau	*Betula pendula L.*	Bétulacées	Birch
Caroubier	*Ceratonia siliqua L.*	Fabacées	Carob tree
Cerisier noir tardif	*Prunus serotina* Ehrh.	Rosacées	American cherry
Chêne de Shumard	*Quercus shumardii* Buckl.	Fabacées	Shumard's oak
Chêne vert	*Quercus ilex L.*	Fabacées	Holm oak
Colza	*Brassica napus L.*	Brassicacées	Rape
Cotonnier	Genre *Gossypium* L.	Malvacées	Cotton
Epicéa commun	*Picea abies L.*	Pinacées	Norway spruce
Erable à sucre	*Acer saccharum L.*	Sapindacées	Sugar mapple
Erable rouge	*Acer rubrum L.*	Sapindacées	Red mapple
Fétuque	Genre *Festuca L.*	Poacées	Fescue
Grande mauve	*Malva sylvestris*	Malvacées	Common mallow
Haricot commun	*Phaseolus vulgaris L.*	Fabacées	Bean
Hêtre	*Fagus sylvatica L.*	Fagacées	Beech
Maïs	*Zea mays L.*	Poacées	Maize
Navet	*Brassica rapa L.*	Brassicacées	Turnip
Olivier	*Olea europaea L.*	Oléacées	Olive tree
Orge commune	*Hordeum vulgare L.*	Poacées	Barley
Oseille	Genre *Rumex L.*	Polygonacées	Sorrel (ou dock)
Pastèque	*Citrullus lanatus L.*	Cucurbitacée	Watermelon
Pêcher	*Prunus persica* (L.) Batsch	Rosacées	Peach
Peuplier	*Genre Populus*	Salicacées	Poplar
Peuplier baumier	*Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray	Salicacées	Black cottonwood
Peuplier blanc	*Populus alba L.*	Salicacées	White poplar
Peuplier deltoïde	Populus deltoides Bartr. ex Marsh.	Salicacées	Eastern cottonwood
Peuplier faux-tremble	*Populus tremuloides* Michx.	Salicacées	Quaking aspen
Peuplier grisard	*Populus canescens* (Aiton) Smith Croisement *P. tremula x alba*	Salicacées	Grey poplar
Peuplier hybride euraméricain	*Populus x canadensis* Moench Croisement *P. deltoides x nigra*	Salicacées	Hybrid Black Poplar
Peuplier hybride interaméricain	*Populus trichocarpa x deltoides*	Salicacées	Hybrid poplar
Peuplier japonais	*Populus maximowiczii L.*	Salicacées	Japanese poplar
Peuplier noir	*Populus nigra L.*	Salicacées	Black poplar
Peuplier tremble	*Populus tremula L.*	Salicacées	Aspen
Pin blanc	*Pinus strobus L.*	Pinacées	White pine
Pin d'alep	*Pinus halepensis L.*	Pinacées	Aleppo pine

Nom commun français	***Nom binominal***	**Famille**	**Nom commun anglais**
Pin jaune	*Pinus ponderosa* C. Lawson	Pinacées	Ponderosa pine
Pin loblolly	*Pinus taeda L.*	Pinacées	Loblolly pine
Pin sylvestre	*Pinus sylvestris L.*	Pinacées	Scots pine
Pomme de terre	*Solanum tuberosum L.*	Solanacées	Potato
Potiron	*Cucurbita maxima* Duch.	Cucurbitacée	Winter squash
Radis	*Raphanus sativus L.*	Brassicacées	Radish
Riz	*Oryza sativa L.*	Poacées	Rice
Sapin de Douglas	Genre *Pseudotsuga* Carr.	Pinacées	Douglas fir
Séquoia géant	*Sequoiadendron giganteum (Lindl.) J.Buch.*	Cupressacées	Giant sequoia
Soja	*Glycine max L.*	Fabacées	Soybean
Tabac	*Genre Nicotiana L.*	Solanacées	Tobacco
Tomate	*Solanum lycopersicum L.*	Solanacées	Tomato
Tulipier	*Liriodendron tulipifera L.*	Magnoliacées	Yellow poplar

ANNEXE 4

Liste des publications

Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves.

Bagard M., Delacote E., Hasenfratz-Sauder M.-P., Le Thiec D., Banvoy J., Dizengremel P. & Jolivet Y.

(**soumise**) *Tree physiology*

A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism.

Bohler S., Bagard M., Oufir M., Planchon S., Hoffmann L., Jolivet Y., Hausman J.-F., Dizengremel P. & Renaut, J.

(**2007**) *Proteomics*, **7** (10): 1584-1599.

Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power.

Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M. & Jolivet, Y.

(**sous presse**) *Environmental Pollution*.

Impact de l'ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (*Populus* x *canescens* [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire. Aspects écophysiologiques et cellulaires.

Résumé : L'ozone est aujourd'hui considéré comme le premier polluant atmosphérique en termes de phytotoxicité. Bien que ses effets sur le métabolisme des arbres forestiers soient documentés, la réponse de la photorespiration et la relation entre le développement des feuilles et leur sensibilité à l'ozone restent méconnues. Afin d'étudier ces aspects, de jeunes plants de peuplier (*Populus* x *canescens* [Aiton] Sm.) ont été soumis en chambres de fumigation à une concentration de 120 ppb en ozone pendant 35 jours. Les arbres traités ont montré des symptômes foliaires (nécrose, chlorose et abscission précoce) ainsi qu'une réduction de la croissance radiale de la tige. Ces effets ont été accompagnés d'une diminution importante de la capacité photosynthétique (A, Φ_{PSII}) des feuilles matures, provenant de l'altération de la capacité de fixation du CO_2 par la rubisco (V_{cmax} et activité *in vitro*) et de la photochimie (chlorophylles, F_v/F_m). Dans ces feuilles, l'exposition à l'ozone a provoqué une réduction importante de l'activité photorespiratoire *in vivo* et de l'activité glycolate oxydase, suggérant une inhibition coordonnée de la photosynthèse et de la photorespiration due à la réduction de la capacité rubisco. Dans ce contexte, l'absence d'effet sur la sous-unité H de la glycine décarboxylase et la stimulation de l'activité glutamine synthétase, deux enzymes pourtant liées à la photorespiration, suggèrent une modification de leur rôle en réponse à l'ozone. Par ailleurs, une stimulation de la respiration mitochondriale et de l'activité phosphénolpyruvate carboxylase est induite par l'ozone et pourrait répondre à une demande accrue en pouvoir réducteur due à la mobilisation du système antioxydant. Le fait qu'aucun des paramètres étudiés n'ait été modifié par l'ozone dans les feuilles en phase précoce d'expansion indique que la sensibilité à l'ozone apparaît au cours du développement foliaire, vraisemblablement au moment de la transition *puits*/*source*.

Mots clés : peuplier ; ozone ; flux stomatique d'ozone ; développement foliaire ; photosynthèse ; photorespiration ; rubisco ; phosphoénolpyruvate carboxylase ; glycine décarboxylase ; glutamine synthétase.

Ecophysiological and cellular aspects of ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar (*Populus* x *canescens* [Aiton] Sm.) during leaf development.

Abstract: Ozone is considered the most important phytotoxic air pollutant and has well known effects on the metabolism of forest trees. However, the role of leaf development in ozone sensitivity remains unclear. In addition, the photorespiratory pathway has been scarcely investigated under ozone stress. To provide new insights into these issues, young poplar trees (*Populus* x *canescens* [Aiton] Sm.) were subjected to 120 ppb of ozone for 35 days in phytotronic chambers. Treated trees displayed foliar symptoms of injury (necrotic spots, chlorosis and precocious leaf senescence) and a reduced stem radial growth. In mature leaves, ozone reduced photosynthesis (A, Φ_{PSII}) by impairing CO_2 fixation, mainly at the level of rubisco (V_{cmax} and *in vitro* activity). Photochemistry was also affected as shown by reduced chlorophyll content and F_v/F_m ratio. The rate of *in vivo* photorespiration and glycolate oxidase activity were reduced along with photosynthetic parameters, suggesting that photosynthesis and photorespiration were both inhibited by the ozone-induced impairment of rubisco. The amount of the H subunit of the glycine decarboxylase and total glutamine synthetase activity were respectively maintained and stimulated. As both enzymes are related to photorespiration, a potential shift in their metabolic involvement could have occurred under ozone stress. In addition, treated leaves showed a stimulation of mitochondrial respiration and phosphoenolpyruvate carboxylase activity which could be related to a higher demand for reducing power to sustain detoxification processes. As none of the parameters were modified by ozone in expanding leaves, ozone sensitivity may appear during leaf development, possibly when developing leaves undergo sink/source transition.

Keywords: poplar; ozone; stomatal ozone uptake; leaf development; photosynthesis; photorespiration; rubisco; phosphoenolpyruvate carboxylase; glycine decarboxylase; glutamine synthetase.