



HAL
open science

Réponses de détoxification de deux génotypes de peuplier soumis à un stress ozone et sécheresse : rôle du métabolisme du glutathion

Nicolas Dusart

► **To cite this version:**

Nicolas Dusart. Réponses de détoxification de deux génotypes de peuplier soumis à un stress ozone et sécheresse : rôle du métabolisme du glutathion. Sciences de l'environnement. 2014. hal-01836074

HAL Id: hal-01836074

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01836074>

Submitted on 12 Jul 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

2013-2014

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

Spécialité
Biologie Intégrative de l'Arbre et des plantes cultivées

Réponses de détoxification de deux génotypes de peuplier soumis à
un stress ozone et sécheresse :
rôle du métabolisme du glutathion



Nicolas Dusart
Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2014
Marie-Noëlle Vaultier, maître de conférences

UMR 1137 Écologie et Écophysiologie Forestières (EEF)
INRA - Université de Lorraine

Remerciements

C'est avec plaisir que je prends le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont assisté physiquement et moralement au cours de ce stage de M2.

Tout d'abord, un grand merci à Marie-Noëlle Vaultier pour m'avoir permis de faire ce stage, mais surtout pour sa bonne humeur et son soutien sans faille dans l'élaboration de ce rapport.

Je remercie aussi Yves Jolivet pour avoir toujours pris le temps de m'écouter.

J'adresse également toute ma gratitude à Christelle Colignon pour son aide précieuse à diverses étapes de la manip' et pour ses conseils avisés.

Je tiens à remercier Stéphane Martin pour m'avoir tenu compagnie lors de certains moments de solitude dans les chambres de culture et m'avoir montré le fonctionnement des dites chambres.

Merci à Dominique Gérant, Irène Hummel, Joëlle Gérard, Christelle, Jonathan, Clotilde pour avoir mis la main à la terre lors du lavage des racines de peupliers.

Merci à tous les membres du laboratoire que je n'ai pas cité pour des moments mémorables passés dans la salle café.

Je remercie Fatou Kiné et Céline pour m'avoir supporté six mois dans le bureau et pour leur aide dans la confection des 11 commandements... Ainsi qu'aux M1 qui sont venus égayer la vie de notre bureau de stagiaires pendant deux mois et pour leur respect plus ou moins aléatoire des 11 commandements.

Je tiens à souligner également la bravoure de mon ordinateur HP Pavillon qui a sacrifié ses dernières forces pour que je puisse écrire ce rapport et qui, malheureusement, n'a pas pu en voir l'aboutissement.

Et enfin merci aux 128 peupliers qui ont donné leur vie à la science.

Sommaire

Introduction.....	1
Matériels et méthodes.....	4
1.Matériel végétal.....	4
2.Conditions de culture.....	4
3.Chronologie.....	4
4.Paramètres observés/mesurés :.....	5
a) Mesure des paramètres morphologiques.....	5
b) Mesure des paramètres écophysiologicals.....	5
c) Mesure et dosage des chlorophylles.....	5
d) Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène par le DAB.....	6
e) Mesure des paramètres biochimiques et moléculaires.....	6
i.Dosage de Glutathion Réductase et Déhydroascorbate Réductase.....	6
ii.Expression de gènes : RT-PCR quantitative.....	7
5.Analyses statistiques.....	8
Résultats.....	9
1.Modification de la croissance et de la biomasse.....	9
a) Évolution de la croissance.....	9
b) Évolution du feuillage.....	10
c) Évolution de la biomasse.....	11
2.Suivie des chlorophylles et des échanges gazeux.....	11
a) Évolution des chlorophylles totales.....	11
b)Échanges gazeux foliaires.....	12
3.Symptômes foliaires et cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène.....	14
4.Activités enzymatiques : Déhydroascorbate Réductase et Glutathion Réductase.....	15
5.Expression de gènes : Déhydroascorbate Réductase et Glutathion Réductase.....	16
Discussion.....	17
1.Effet des stress sur le développement et réponses écophysiologicals.....	17
a) Deux génotypes tolérants à la sécheresse ?.....	17
b) Des dégâts foliaires différents, mais une réponse identique à l'ozone.....	18
c) Différence de sensibilité au stress combiné.....	19
2.Stress, détoxication et génome.....	19
a) Induction de la détoxication, un effet traitements.....	19
b) Différence de sensibilité à l'ozone, une détoxication différente ?.....	20
Conclusion et Perspectives.....	23
Références bibliographiques.....	24
Annexes.....	27

Introduction

Les émissions polluantes anthropiques sont la cause directe ou indirecte de nombreuses contraintes que doivent supporter les organismes vivants. Du fait de leur immobilité, les plantes sont plus confrontées aux variations environnementales et souvent à plusieurs facteurs de stress simultanés.

L'augmentation des concentrations de CO₂ atmosphérique a été identifiée comme une des causes principales du réchauffement climatique, réchauffement qui devrait être selon les scénarii d'émission de gaz à effet de serre de l'ordre de 2 à 5 °C supplémentaires sur la température moyenne d'ici la fin du siècle (IPCC, 2013). Cette hausse aura pour conséquences : l'augmentation des épisodes climatiques extrêmes, une diminution de la pluviométrie et l'augmentation des phases de sécheresses. On observe déjà une mortalité accrue des peuplements forestiers à cause de la sécheresse et de l'augmentation de température avec un risque accru d'observer une multiplication des dépérissements de forêts dans le futur (Allen et al., 2010).

L'ozone ou trioxygène (O₃) est connu depuis 1789. Il est présent dans la haute atmosphère et crée une barrière aux UV. On le trouve également dans la troposphère à des concentrations très faibles de l'ordre de 10 à 50 ppb. L'ozone est un polluant secondaire, formé à partir de précurseurs, les oxydes d'azote (NO_x) d'origine anthropique ou les composés organiques volatils (COV). Ces précurseurs vont former de l'ozone par réaction photochimique en présence d'oxygène. Actuellement, la concentration d'ozone troposphérique à la surface du globe est stable. Les concentrations varient en fonction des régions. On observe des augmentations en Asie et des diminutions en Europe due à la politique de réduction des NO_x (Oltmans et al., 2013). Malgré ces efforts, dans certaines zones périurbaines subsistent de forts taux de précurseurs de l'ozone, où l'on observe de fortes concentrations d'O₃ localisées. Si l'ozone à forte concentration est néfastes pour la santé humaine, une plante exposée à des concentrations élevées d'ozone subit également un stress. Sur les feuilles apparaissent des symptômes visibles à l'œil nu tels que des chloroses et des nécroses. De plus, on observe une diminution de la photosynthèse et donc du développement du végétal (Wittig et al., 2009).

Dans la nature, les périodes de sécheresse sont en général accompagnées de forte chaleur et d'une faible couverture nuageuse. Ces conditions sont optimales pour la production d'ozone par réaction photochimique. Il est ainsi évident que les arbres en milieux naturels peuvent être soumis à l'effet des deux stress combinés. Cependant, les effets d'un stress combiné ozone et sécheresse sont relativement méconnus. En effet, on pourrait s'attendre à observer une diminution de l'effet de l'ozone, dû à la fermeture des stomates sous sécheresse. D'ailleurs chez *Picea abies*, un effet antagoniste des deux stress a été mis en évidence (Kronfuß et al., 1998) ainsi que chez le hêtre (Dixon et al., 1998) avec sous sécheresse une limitation des nécroses due à l'ozone. Cependant, pour l'épicéa, les effets de la sécheresse sur la biomasse sont également accentués par l'ozone (Dixon et al., 1998). Dans le même ordre d'idée, l'ozone pourrait avoir un effet synergique avec la sécheresse en perturbant la fermeture stomatique notamment chez le peuplier (Pollastrini et al., 2014; Bohler et al., 2013). Cependant, la sécheresse entraînant comme l'ozone, un stress oxydant, le cumul des deux stress pourrait avoir un effet encore plus négatif sur les plantes ou un effet de tolérance croisée (Tausz et al., 2007). Comprendre comment les arbres répondent face à un stress combiné fait partie des manques actuels et permettra d'améliorer notre compréhension des effets des changements climatiques et de la pollution atmosphérique sur le développement des forêts (Matyssek et al., 2012).

La plupart des contraintes biotiques ou abiotiques entraînent un stress oxydant chez les plantes. Ce stress est dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion super oxyde (O₂⁻), etc. Le stress oxydant peut se traduire par un taux d'oxydation incontrôlé causé par un taux de production de ROS qui excède les capacités

métaboliques de la plante (Foyer, Noctor, 2011).

L'ozone qui est un gaz avec un fort pouvoir oxydant, va pénétrer par les stomates à l'intérieur de la feuille et entraînera ainsi un stress oxydant (Iriti et Faoro, 2007). En effet, une fois dans la cavité sous stomatique, l'ozone va réagir immédiatement pour former des ROS qui seront pris en charge par les systèmes de détoxification de la cellule (Laisk et al., 1989). Dans le cas de la sécheresse, on observe un phénomène de production endogène de ROS dû à des fuites d'électron surtout au niveau des photosystèmes à l'intérieur des chloroplastes (Edreva, 2005). Que ce soit dans le cas de l'ozone ou de la sécheresse, la plante présente deux niveaux de défenses (Castagna et Ranieri, 2009). Le premier est l'évitement par fermeture des stomates. Dans le cas de la sécheresse, le contrôle des stomates permet de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration. Tandis que dans le cas de l'ozone, il permet de limiter les entrées du gaz. Cependant la plante doit faire un compromis avec ses entrées de CO₂ pour alimenter la photosynthèse. Pour cela, le deuxième niveau de défense est représenté par l'ensemble des mécanismes de détoxification et de réparation cellulaire face au ROS. On peut distinguer 2 catégories de défenses (De Gara et al., 2010): un premier type de réponse basé sur des enzymes, la superoxyde dismutase (SOD) et les catalases (CATs) ; et en deuxième ligne, les antioxydants. Ce sont de petits métabolites de faibles poids moléculaires, présents à des concentrations plus faibles que le substrat utilisable, mais qui peuvent prévenir ou inverser leur oxydation (Halliwell et Gutteridge, 1989 dans De Gara et al., 2010). Le plus abondant dans les cellules végétales est l'ascorbate ou vitamine C, mais il en existe de nombreux autres tels le glutathion (GSH, γ -Glutamyl-Cystéinyl-Glycine), la N-acetylcystéine, le tocopherol, et des phénols (caroténoïdes...). Si le stress est trop intense et que les molécules de défenses sont dépassées, le maintien de l'homéostasie cellulaire est impossible et les ROS conduisent à l'apoptose ou mort cellulaire.

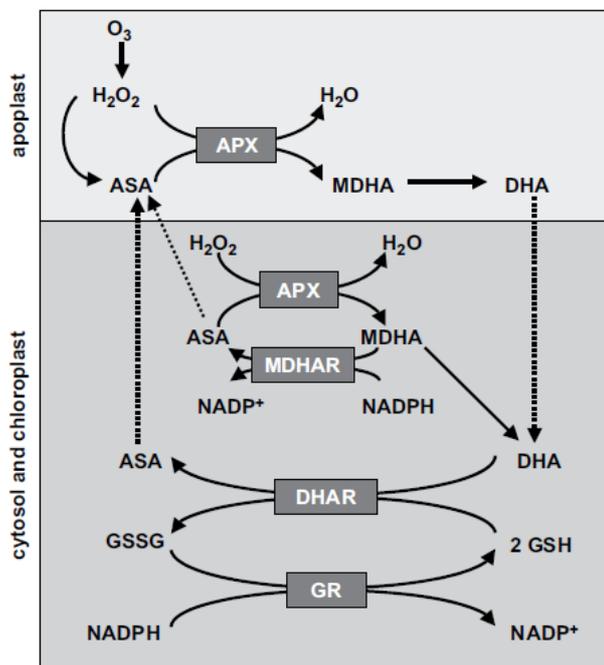


Figure 1 : Réactions d'oxydoréduction de l'ascorbate dans la cellule d'une plante exposée à l'ozone. L'ascorbate réduit (ASA) est oxydé par les ROS issus de l'ozone directement ou indirectement par l'ascorbate peroxidase (APX). Le monodéhydroascorbate (forme oxydée) est recyclé en ASA par le cycle Halliwell-Asada-Foyer.

DHA, déhydroascorbate;

DHAR, déhydroascorbate réductase;

GR, glutathion réductase ;

GSH, glutathion réduit ;

GSSG, glutathion oxydé ;

MDA, monodéhydroascorbate ;

MDAR, monodéhydroascorbate réductase.

(Castagna, Ranieri, 2009)

L'ascorbate et le glutathion se distinguent des autres antioxydants pour trois raisons. Premièrement, ils sont couplés au métabolisme du peroxyde par des enzymes spécifiques (des peroxydases, la glutathion S-transférase...). Deuxièmement, les formes oxydées sont relativement stables. Et troisièmement, ces formes oxydées peuvent être recyclées grâce à des enzymes tirant leur pouvoir réducteur du NAD(P)H. C'est à partir de ces propriétés qu'en 2011, Christine Foyer et Graham Noctor définissent le cycle Halliwell-Asada-Foyer (Figure 1) comme « The heart of the Redox Hub ». Bien que l'ascorbate soit l'antioxydant majoritaire de la cellule végétale, la réaction

avec les ROS dans l'apoplaste n'est pas suffisante pour expliquer des différences de sensibilité entre deux génotypes de peuplier (Ranieri et al., 1999). Des travaux récents réalisés dans le laboratoire montrent un fort effet du traitement ozone sur les gènes de la biosynthèse du glutathion et des différences importantes de pool de glutathion réduit entre peuplier tolérant et sensible (Dumont et al., 2014). On peut supposer que les différences de sensibilité entre génotypes de peuplier pourrait être liés au glutathion, permettant notamment une meilleur régénération de l'ascorbate.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon stage de master 2 au sein du projet DETPOP financé par le Labex ARBRE. Ce projet vise à mettre en évidence l'importance du glutathion dans les processus de détoxification du peuplier face à un stress oxydant généré par la sécheresse et ou l'ozone. Cette étude s'inscrit parfaitement dans les axes de recherches de l'équipe Physiologie et Diversité de la réponse aux contraintes (PhysioDiv) de l'UMR 1137 Écologie Écophysiologie Forestières (EEF) INRA – Université de Lorraine. Cette équipe s'intéresse aux réponses des arbre face à des fluctuations environnementales et analyse les réponses à différentes échelles, du gène à la plante entière.

Le peuplier est une plante modèle, notamment en biologie moléculaire, choisie pour sa croissance rapide et son génome entièrement séquencé en 2006. C'est également une essence avec un fort intérêt économique pour la France qui en est le premier producteur européen.

Les objectifs de mon travail sont donc de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre dans les processus de détoxification du peuplier et de mettre en évidence les éléments-clés. Mon projet consistait donc à étudier plus particulièrement et à comparer le métabolisme du glutathion lors d'un stress oxydant généré par la sécheresse, par l'ozone, ou par la combinaison des deux.

Pour cela, deux génotypes de peupliers (Robusta et Carpaccio), différant par leur sensibilité à l'ozone, ont été utilisés comme outils. Ces 2 génotypes ont été sélectionnés précédemment dans l'équipe par leur différence de sensibilité à l'ozone portant à la fois sur les nécroses observées, leur réponse de détoxification (différent niveaux de glutathion) et différentes réponses stomatales à l'ozone (Dghim et al., 2012 ; Dumont, 2013), Carpaccio apparaissant comme plus tolérant à l'ozone que Robusta.

Mon travail a donc consisté à mettre en œuvre l'expérimentation au cours de laquelle les peupliers ont été soumis aux différents stress oxydants (générés par l'ozone ou la sécheresse, ou par la combinaison des deux). Au cours de cette expérimentation, j'ai caractérisé la réponse de chaque génotype d'un point de vue physiologique et écophysiologique (phénologie, échanges gazeux) sur plants entiers. Ensuite, à partir des échantillons foliaires récoltés à différents temps de l'expérimentation, j'ai analysé d'un point de vue biochimique et moléculaire, deux enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion : la glutathion réductase et la déhydroascorbate réductase (expression des gènes et activités enzymatiques).

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Deux génotypes de peuplier euraméricains (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) ont été choisis pour l'expérience : Robusta et Carpaccio. Le choix de ces deux variétés repose sur une sensibilité différente à l'ozone, Robusta étant plus sensible à l'ozone tandis que Carpaccio est plus résistant. En effet, sous des flux d'ozone similaires, les 2 génotypes présentent des différences macroscopiques quant aux dommages foliaires. Pour Robusta, les dommages sont rapidement visibles, avec l'apparition de nécroses sur de larges surfaces ; tandis que Carpaccio présente des nécroses moins importantes (Dghim et al., 2012 ; Dumont, 2013).

2. Conditions de culture

Pour chaque traitement, le matériel végétal a été cultivé dans des conditions identiques. Les boutures de peuplier (Pépinières ONF Guéméné-Penfao) ont été plantées dans des pots de 5 L remplis de terreau (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg.m⁻³, Gramoflor SP1 Universel) 6 semaines avant le début de la fumigation d'ozone. Au fond des pots, 100 g de billes d'argile de diamètre 8/16 permet d'améliorer le drainage de l'eau. Chaque pot reçoit une quantité égale de terreau de 1,7 kg, pour limiter les hétérogénéités. De plus, 5 mg de Nutricote T-100 (N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France) ont été ajoutés pour fertiliser le milieu.

Dans la chambre de culture, la température et l'humidité relative ont été maintenues à 23°C/75% le jour et 20°C/85% la nuit avec une photopériode de 14 heures (8h-22h) générée par cinq lampes. Les arbres ont été arrosés manuellement tous les jours. Cinq semaines après la plantation des boutures, les peupliers sont transférés en phytotrons pour acclimatation. Enfin, après une semaine d'acclimatation, l'expérience proprement dite a commencé (jour 1) i.e les arbres sont soumis à la fumigation d'O₃ et/ou à la sécheresse.

Le dispositif de culture est constitué de 8 chambres phytotroniques. Pour avoir suffisamment de répétition par génotypes et traitements, nous avons fait pousser les génotypes en décalé de manière à d'abord réaliser l'expérience sur Robusta puis sur Carpaccio. L'expérience comptabilise 64 plants par génotype, répartis aléatoirement entre 4 traitements différents (témoin, sec, ozone, ozone sec). Soit 16 plants par traitement avec 8 plants par chambre phytotronique (Annexe 1). Les peupliers humides et secs sont répartis de manière égale dans chaque phytotron. Quatre phytotrons sont dédiés au traitement ozone. Pour ce traitement, les peupliers sont soumis à une exposition chronique à l'ozone, soit une concentration de 120 ppb sur une période de 13 heures par jour (9h-22h).

Les plantes soumises à la sécheresse sont irriguées de manière à avoir une humidité du sol proche de 30 % durant les 7 premiers jours en phytotron. Puis l'humidité du sol est amenée à 15 % pour les 10 derniers jours de l'expérimentation. Pour maintenir ce niveau, une courbe étalon du poids de terre en fonction de l'humidité par pots a été réalisée grâce à une sonde Trime-FM (IMKO GmbH, Ettlingen, Germany). Cette sonde, basée sur la technologie TDR (Time Domain Reflectometry), les mesures de potentiel diélectrique grâce aux 2 broches de 11 cm de la sonde permettent de déterminer l'humidité relative du sol. Dans nos conditions expérimentales, les plants témoins humides sont maintenus à un poids de 3,8 kg correspondant à la capacité au pot (environ 50 % d'humidité), tandis que les plants secs sont maintenus à 2,5 kg les 7 premiers jours puis 2 kg, respectivement 30 % et 15 % d'humidité. Étant donné l'âge des plants et des raisons pratiques, la variation du poids dû à l'augmentation de biomasse a été négligée.

3. Chronologie

La récolte de matériels végétaux a lieu à trois dates : 2, 11 et 17 jours après le début de la fumigation. Lors de la mise en acclimatation des peupliers dans les phytotrons, les feuilles situées en 10^e position par rapport à l'apex, ont été marquées par un fil de laine. Lors de la récolte, la 10^e et la 9^e feuilles ont été récoltées. Après le retrait de la nervure principale, deux mixtes de feuille

comportant chacun une moitié de chaque feuille prélevée ont été aussitôt plongés dans l'azote liquide.

4. Paramètres observés/mesurés :

a) Mesure des paramètres morphologiques

À six temps différents, la hauteur, le diamètre et le nombre de feuilles ont été caractérisés pour chaque arbre. La hauteur a été mesurée à l'aide d'un mètre ruban de la base de la tige au niveau de la bouture jusqu'à l'apex. Pour le diamètre, des mesures au pied à coulisse ont été réalisées à la base de la tige à environ 1,5-2 cm de la base de la tige. Le nombre de feuilles sur l'arbre a été mesuré de la feuille la plus basse à la dernière feuille décollée de l'apex. Les feuilles tombées dans le pot ont été également comptées et considérées comme de la biomasse perdue. En fin d'expérimentation, les arbres ont été coupés pour déterminer la biomasse. La masse fraîche des feuilles a été déterminée au moment de l'abattage puis la masse sèche après quatre jours à l'étuve réglée à 75 °C. De la même manière, la MF des tiges a été déterminée après division de celle-ci en tronçon d'environ 5 cm, mais après 10 jours de séchage. Le lavage des racines ne permettant pas de déterminer de masse fraîche, les racines sont séchées pendant 10 jours à 75 °C avant d'être pesées.

b) Mesure des paramètres écophysiologicals

Des mesures d'échanges gazeux foliaires instantanés ont été réalisées à l'aide d'un Licor 6200 (Licor, Inc. Lincoln, NE, USA) pour déterminer la conductance stomatique (Gs) et l'assimilation de CO₂ (A). Le flux d'air dans la chambre est de 450 μmol⁻¹. La mesure est prise après 30 secondes de stabilisation. Le Licor 6200 est équipé d'une pompe qui va faire passer l'air de la chambre dans un analyseur de CO₂ avant de le retourner dans la chambre, on parle de circuit fermé. Le Licor va donc mesurer la différence de concentration en CO₂ dans la chambre au cours des 30 secondes. Ceci permettra de calculer l'assimilation en prenant en compte d'autres facteurs tels la surface de la feuille, la pression atmosphérique, la température. La conductance stomatique, elle est calculée grâce à la variation d'humidité dans la chambre au cours du temps qui est dû à la transpiration. Le calcul prend également en compte des facteurs tels que la conductance à la vapeur d'eau, la pression de vapeur dans la chambre, etc.

Ces deux paramètres permettent de calculer l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUEi) grâce à la formule suivante : $WUEi = A/Gs$.

c) Mesure et dosage des chlorophylles

La teneur en chlorophylles a été déterminée sur les feuilles sur lesquelles les échanges gazeux ont été mesurés. À l'aide d'un chlorophylle-mètre CCM-200 (Opti-Sciences, Inc., Hudson, USA), 4 à 5 mesures ont été mesurées sur l'ensemble de la feuille, puis moyennées afin de limiter les erreurs liées à des différences de concentration en chlorophylles sur la surface totale de la feuille ou bien à cause d'une nervure. Les valeurs sans unités données par l'appareil ont été converties grâce à une gamme étalon réalisée par dosage des chlorophylles à l'acétone. Pour cela, 16 feuilles (provenant de plants différents) ont été prélevées aléatoirement parmi les arbres des quatre traitements de Robusta en fin d'expérience. 200 mg de matériel frais ont été broyés dans un mortier avec un peu de sable de Fontainebleau et 1 ml d'acétone pure. Le broyat est ensuite transvasé dans un tube Eppendorf de 2 ml. Le mortier est rincé avec 1ml d'acétone 80 % pour récupérer la totalité du broyat. Après 5 min de centrifugation à 13 000 rpm, le surnageant est récupéré dans un tube de 15 ml, puis le volume est ajusté avec de l'acétone à 5 ml ou 10 ml en fonction de la concentration en chlorophylles (afin de rester dans la gamme de linéarité de lecture du spectrophotomètre). Après agitation, on transvase 1 ml dans une cuve de spectrophotomètre pour lire la densité optique à 652 nm. Une cuve d'acétone 80 % est utilisée pour rétablir le zéro d'absorbance. La concentration en chlorophylles en mg.ml⁻¹ est donnée par la relation suivante : $[Chl\ t] = Do\ 652\ nm / 34,5$

d) Mise en évidence du peroxyde d'hydrogène par le DAB

Le 3,3'-diaminobenzidine (DAB)(Sigma D8001) est oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former un précipité marron-brun. Le protocole est adapté de celui de Daudi et O'Brien, (2012). Ceci permet la mise en évidence visuelle de la localisation cellulaire de H_2O_2 .

Pour chacun des génotypes et chaque traitement, une feuille a été prélevée sur deux arbres provenant de chambres différentes. Trois disques ont été découpés dans chaque feuille avec un emporte-pièce de 6 mm de diamètre. Les disques foliaires ont été disposés dans deux microplaques de 12 puits chacune. Dans chaque puits, 1,5ml d'une solution de 1 % DAB (w/v), MES 10 mM (pH 5,8), Tween 20 (0,05% v/v) sont ajoutés. Quatre puits témoins où de l'ascorbate 10mM est ajouté à la solution précédente pour contrôler l'effet du DAB en éliminant le peroxyde d'hydrogène par réduction de celui-ci par l'ascorbate. Également, quatre puits de la solution tampon sans DAB sont préparés. Les disques ont été ensuite infiltrés 4 x 15min, puis placés une nuit à l'obscurité. L'étape suivante est une étape de décoloration dans une solution éthanol :acétate :glycérol (3:1:1) bouilli à 100°C pendant environ 20 min. Le tout est conservé à une température de 4°C. 24h plus tard les disques ont été observés dans une solution de glycérol 50 % à l'aide d'un stéréomicroscope Nikon SMZ 1000 (grossissement 0,8x). Les disques entiers ont été reconstitués grâce au logiciel de traitements d'image GIMP 2.8.

e) Mesure des paramètres biochimiques et moléculaires

i. Dosage de Glutathion Réductase et Déhydroascorbate Réductase (Collaboration avec Christelle Colignon)

Procédure extraction et filtration

Environ 50 mg de poudre de feuille est homogénéisé dans 1,3 mL d'une solution contenant 100 mM de tampon Bicine-KOH (pH 7,8), 0.10 % (v/v) de Triton, 6 % (m/m) de PVP25, 10 % (v/v) de glycérol, 5 mM d'EGTA, 5 mM de $MgCl_2$, 10 % de PVPP (m/m) et 0,28 % (v/v) de cocktail protéase inhibiteur. Après centrifugation (20 000 x g pendant 20 min à 4°C), le surnageant est récupéré. Ensuite, 1 mL de surnageant est déposé sur une colonne (PD MiniTrap G25), puis élué avec 1,5 mL d'une solution contenant 100 mM de tampon Bicine-KOH (pH 7,8), 5 mM de $MgCl_2$, et 10% (v/v) de glycérol. La solution éluée est collectée. Une partie de cette solution est immédiatement utilisée pour le dosage des activités DHAR ET MDHAR et pour le dosage des protéines solubles. Le dosage de l'activité GR est réalisé sur la solution éluée stockée à -80°C après addition d'une solution de DTT à 2 mM. Toutes les opérations ont été réalisées entre 0 et 4°C.

Dosage de la Déhydroascorbate Réductase (DHAR, EC 1.8.5.1)

L'activité DHAR est mesurée avec un protocole légèrement modifié de celui décrit initialement par Hossain et Asada (1984). La réaction est réalisée en microplaques dans un volume final de 200 μ L contenant : 100 mM de tampon HEPES-KOH (pH 7), 2,5 mM de Glutathion réduit (GSH), 1 mM d'EDTA, 0,2 mM DHA et 5 μ L d'extrait filtré. La réaction est initiée par l'addition de DHA. La réaction est réalisée à 25°C. La réaction est suivie pendant 5 min par augmentation de l'absorbance de l'ascorbate à 265 nm. La réaction non-enzymatique du DHA par GSH est déduite. Le niveau de réaction est corrigé en multipliant par un facteur de 0,98 (correction liée à l'absorbance de GSSG à 265 nm) (Asada, 1984). 4 répétitions par répliques ont été réalisées. L'activité DHAR est exprimée en nmol d'ascorbate produit par minute et par mg de protéines.

Dosage de la Glutathion Réductase (GR, EC 1.6.4.2)

L'activité GR est mesurée selon la méthode décrite par Foyer et Halliwell (1976). La réaction est réalisée en microplaques dans un volume final de 200 μ L contenant : 100 mM de tampon Tris-HCL (pH 7,8), 1 mM de Glutathion oxydé (GSSG), 1 mM d'EDTA, 0,2 mM NADPH

et 20 µL d'extrait filtré (contenant 2 mM de DTT). La réaction est initiée par l'addition de NADPH. La réaction est réalisée à 30°C. La réaction est suivie pendant 15 min par diminution de l'absorbance du NADPH à 340 nm. Une correction est faite par l'oxydation du NADPH en l'absence de GSSG. 3 répétitions par répliquas ont été réalisées. L'activité GR est exprimée en nmol de NADPH oxydé par minute et par mg de protéines.

ii. Expression de gènes : RT-PCR quantitative

Les gènes d'intérêts ont été sélectionnés par homologie avec les séquences spécifiques de chaque gène connu chez *Arabidopsis thaliana* (*At3g24170* pour *GRA* et *GRB*, et *At3g54660* pour *GR2*) sur la base du génome de *Populus trichocarpa* v3.0 disponible en ligne sur l'outil de bio-informatique Phytozome v9.1. Des amorces ont été dessinées pour chacun des gènes sélectionnés, en veillant à leur spécificité (Annexe 2).

Gène	Référence	Amorces	Amplicon (pb)	Prédiction de la localisation subcellulaire des protéines
DHAR3	Potri.008G049300 (Phytozome)	sens : AATGGCTTTAGAGATCTGTG anti-sens : GAGGTTTATCACCCAGATTG	146	Cytoplasmique
GR2	Potri.015G037800.1 (Phytozome)	sens: TCGATCCGCACACAGTTGAT anti-sens: TCTCCGGCTTAGATGGCAAAA	153	Chloroplastique
GRB	Potri.001G050000 (Phytozome)	sens : TAGGGCTCAACGACCAGCTA anti-sens : ACACCACTGCACGCTTAGGC	92	Cytoplasmique
GRA	Potri.003G178200 (Phytozome)	sens: TAAGGCTCAGCGTCCCAATA anti-sens: GCACTACTGCACGCTTTGGT	92	Cytoplasmique
GUT1	estEXT_fggenes4_pg.C_LG_ll1155 (Gutierrez et al., 2008)	sens: GCGGAAAGAAAACTGCAAG anti-sens : TGACAGCACAGCCCAATAAG	126	Gène de référence

Tableau 1 : Présentation des gènes d'intérêts sélectionnés et des amorces sens et anti-sens. Ainsi que, la prédiction de la localisation subcellulaire des protéines obtenu par l'outil de bio-informatique CELLO (cello.life.nctu.edu.tw).

À partir de 100mg de poudre de feuille congelée, on extrait les ARN totaux à l'aide du kit Rneasy Plant mini kit (Qiagen, France) en suivant le protocole du fournisseur. Ensuite, les résidus d'ADN génomique ont été éliminés par un traitement ADNase, en utilisant la ADNase I du kit TURBO DNA-free (Ambion, Life technology) suivant les recommandations du fournisseur. Puis, les échantillons ont été dosés à l'aide d'un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) et leur intégrité vérifiée en regardant les profils de migrations obtenus par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %.

L'étape suivante a consisté à utiliser une reverse transcriptase (RT) pour synthétiser des brins d'ADNc. La RT est réalisée sur des échantillons de concentration 1µg d'ARN. La RT est réalisée grâce au système I cyclor (Bio-rad, laboratories Inc.) et suit le programme suivant : un premier cycle de 5 min à 65°C avant l'ajout du mix du kit iScript cDNA synthesis (BioRad) puis 5 min à 25°C suivis de 30 min à 42°C pour finir avec un cycle de 5 min à 85°C avant le retour des ADNc au congélateur à -20°C. Après la transcription inverse, les ADNc ont été dilués au 1/10^e.

Enfin, l'amplification des ADNc est réalisée grâce à la machine de qPCR : MyiQ (BioRad). Les niveaux relatifs de transcrits ont été évalués par PCR quantitative, dans un volume final, pour chaque échantillon, de 20 µl, contenant 4µl d'ADNc, 0,5µM de chacune des amorces sens et antisens et 10µl de SYBR Green. Les valeurs de Ct pour chaque échantillon ont été acquises par le logiciel iQ5TM (BioRad). Trois répliquats techniques ont été réalisés pour chaque échantillon. Toutes les quantifications ont été répétées avec Quatre répliquats biologiques indépendants (provenant de chacune des quatre chambres de culture). Un échantillon référent (mix de ADNc) a été utilisé pour inter-calibrer les plaques. Le protocole suivant a été utilisé pour l'amplification de chaque ARNm : 3 min à 95°C, puis 40 cycles de 10 sec à 95°C, 30 sec à 58°C, 10 sec à 72°C, les séquences des amorces utilisées pour chaque gène cible sont présentés dans le tableau 1. Afin de vérifier que le signal de fluorescence provient d'un seul amplicon, une analyse de courbe de fusion a été ajoutée à

chaque programme PCR. Les résultats ont été présentés sur une échelle logarithmique relative à la valeur de la condition contrôle de l'expérimentation, qui a été placée à 1. Le gène de peuplier correspondant au locus estEXT_fgenes4_pg.C_LG_II 1155 (Gutierrez et al., 2008) (que nous avons nommé arbitrairement GUT1), orthologue du gène At4g33380 d'*Arabidopsis thaliana*, a été utilisé comme gène de référence pour normaliser les données de qPCR. Pour calculer le niveau d'expression relatif des gènes, la formule suivante a été utilisée :

$$E_C^{(Ct_T - Ct_{exp})} / E_R^{(Ct_T - Ct_{exp})}$$

Où C est le gène cible et R le gène de référence, Ct est le « crossing threshold » (seuil de sortie), T fait référence aux ADNc des échantillons contrôle et « exp » correspond aux ADNc des échantillons ayant subi des traitements (ozone, sec, ozone sec). Par manque de temps, les efficacités spécifiques à chaque couple de primer n'ont pas été déterminées (cela sera fait ultérieurement) et une efficacité standard de 2 a été utilisée pour les calculs.

5. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée sur le logiciel libre R version 3.1.0¹. Pour tous les paramètres, l'effet des traitements a été observé par génotype. La normalité de chaque paramètre a été vérifiée grâce au test de Shapiro-Wilk, au seuil de risque de 0,05 %. Pour respecter l'absence de normalité, des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été réalisés. Les comparaisons multiples entre traitements ont été faites à l'aide de la fonction `kruskalmc` du package `pgirmess`² au seuil de risque 0,05%. Pour les mesures d'échanges gazeux et les activités enzymatiques, des comparaisons entre génotypes et par traitement à chaque temps identique ont été réalisées à l'aide de la fonction `wilcox.test`. Cette fonction permet de réaliser le test U de Mann-Whitney-Wilcoxon au seuil de risque 0,05 %.

1 R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

2 Patrick Giraudoux (2014). `pgirmess`: Data analysis in ecology. R package version 1.5.9. <http://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>

Résultats

Différents paramètres physiologique et écophysiole ont été suivis chez les deux génotypes de peuplier au cours de leur exposition de 17 jours aux différents traitements (Témoin, sec, ozone, ozone sec).

1. Modification de la croissance et de la biomasse

a) Évolution de la croissance

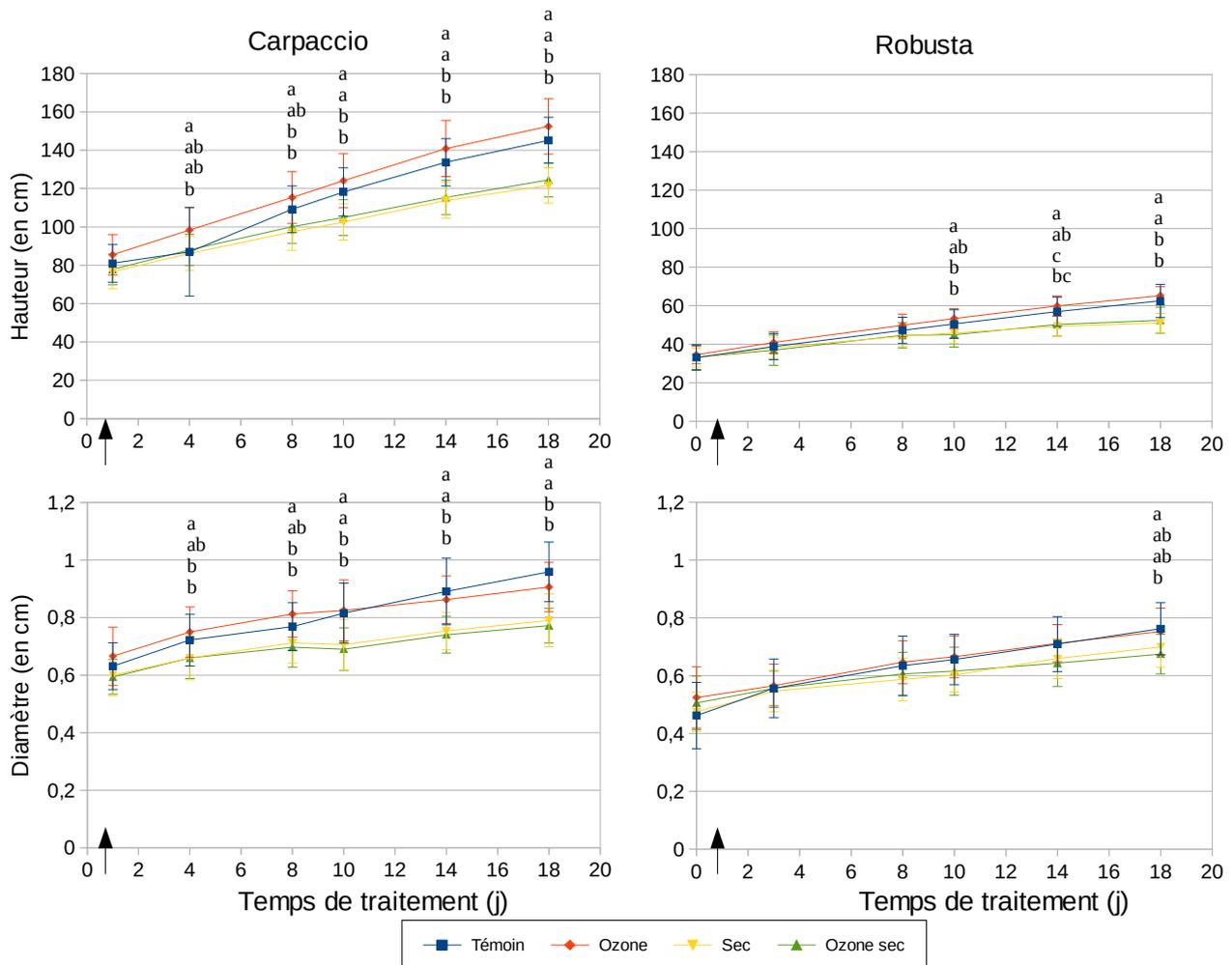


Figure 2 : Effets des différents traitements sur la croissance en hauteur et en diamètre des deux génotypes de peupliers. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, par traitement : $n=16$. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements au seuil de risque de 0,05 %. L'absence de lettre correspond à l'absence de différence significative. La flèche noire marque le début de la fumigation d'ozone pour le lot d'arbres soumis à ce traitement.

En suivant l'évolution de la croissance au cours de l'expérience (Fig.2), une croissance moindre de Robusta est observée par rapport à Carpaccio dès le début de l'expérimentation bien qu'ils aient poussé dans les mêmes conditions. Néanmoins, chez les deux génotypes, les traitements secs ont une croissance plus faible, que ce soit en hauteur ou en diamètre. La diminution de croissance en hauteur observée pour les arbres soumis à la sécheresse est de l'ordre de 20 % de moins par rapport au témoin pour les deux génotypes au bout des 17 jours. De la même manière, pour la croissance en diamètre des traitements secs par rapport au témoin, on observe une diminution de l'ordre de 20 % pour Carpaccio et de 10 % pour Robusta.

b) Évolution du feuillage

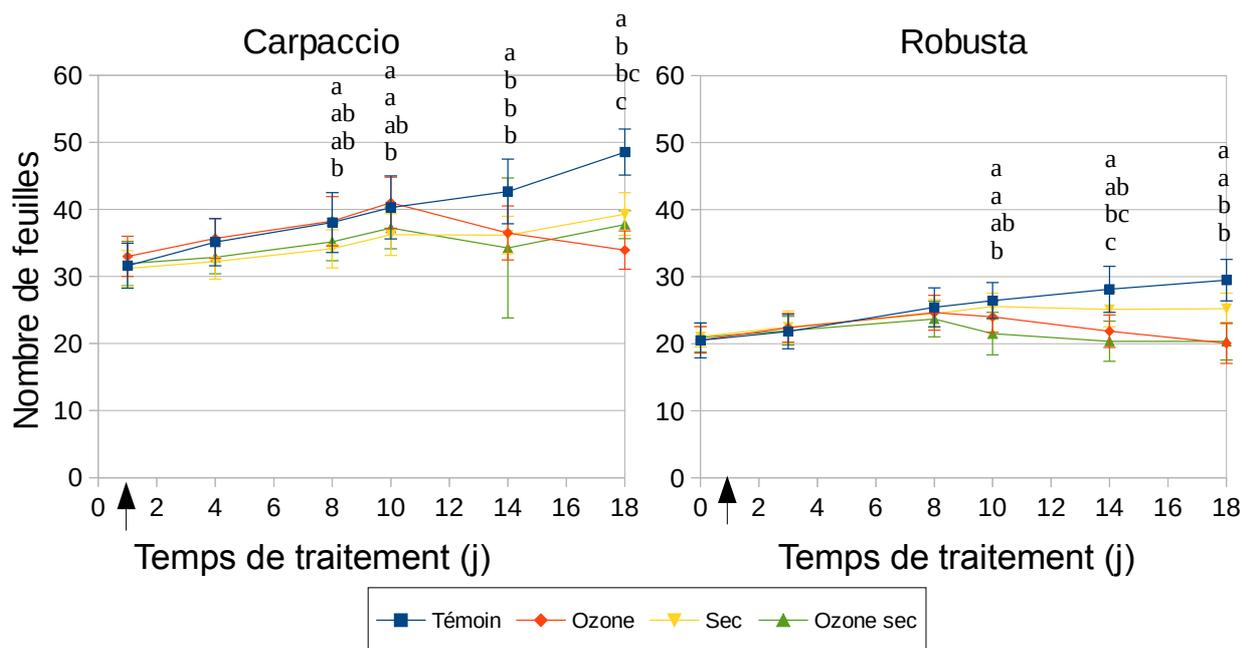


Figure 3 : Effets des différents traitements sur le feuillage des deux géotypes de peuplier. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, par traitement : $n=16$. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements au risque de 0,05 %. L'absence de lettre correspond à l'absence de différence significative. La flèche noire marque le début de la fumigation d'ozone pour le lot d'arbre soumis à ce traitement.

Concernant l'évolution du nombre de feuilles chez les peupliers soumis aux différents traitements (Fig.3), pour l'un ou l'autre des géotypes, on observe en condition de sécheresse un nombre de feuilles moins important que chez le témoin ainsi qu'une tendance à la stabilisation du nombre de feuilles pour les traitements secs. Chez Carpaccio, les traitements sec et ozone sec ont le même comportement ; alors que chez Robusta, on observe une nette stabilisation du nombre de feuilles pour le sec et une diminution en traitement ozone sec. Pour le traitement ozone, de par la chute des feuilles, la tendance est à la diminution chez les deux géotypes.

Si l'on s'intéresse à la chute des feuilles (Tableau 2), celle-ci est bien plus importante pour le traitement ozone que pour les autres traitements. En effet, on observe environ 30 % de feuilles en moins par rapport au témoin pour les deux géotypes. Alors que pour le traitement sec, la chute des feuilles est 2 fois moins importante que pour le traitement ozone et à la différence de l'ozone, les feuilles tombent progressivement au cours du temps (1 à 2 par jour) alors que pour l'ozone, à partir d'un certain temps d'exposition, les feuilles les plus âgées se mettent à chuter simultanément. Un décalage du début de la perte des feuilles est observé chez les deux géotypes : 13e jour pour Carpaccio contre 8e jour pour Robusta (donnée non montrée). Il est également intéressant de noter que pour le traitement combiné (ozone sec) à un niveau intermédiaire de perte des feuilles entre les traitements sec et ozone sont observés pour Carpaccio. Alors que pour Robusta, par rapport au témoin, les arbres en traitement combiné perdent autant de feuilles que sous ozone seul.

Rapporté au témoin, on peut noter qu'en condition de stress, les arbres vont produire plus de feuilles, et de manière différente entre les géotypes : 15-20 % de plus pour Carpaccio contre 40 % pour Robusta. Cependant, cette augmentation ne leur permet pas de maintenir un feuillage important.

Génotype	Carpaccio				Robusta			
	Témoin	Sec	Ozone sec	Ozone	Témoin	Sec	Ozone sec	Ozone
Nombre de feuilles au 17 ^e jour	49	39	38	34	30	25	20	20
Total feuilles perdues au cours des 17 jours	2	19	22	24	3	20	25	26
Total feuilles produites au cours des 17 jours	51	58	60	58	33	45	46	46
% de feuilles par rapport au témoin au 17 ^e jour		-19	-22	-30		-14	-31	-32
% de feuilles produites par rapport au témoin		15	19	14		40	40	41

Tableau 2 : Effets des différents traitements sur le feuillage des deux génotypes de peupliers.

c) Évolution de la biomasse

En étudiant la biomasse obtenue à la fin de l'expérience (jour 18) (Tableau 3), on observe une biomasse plus faible pour Robusta comparé à Carpaccio qui s'explique par leur nette différence de productivité (Fig.2) i.e une croissance caulinaire et foliaire plus importante de Carpaccio. Pour les traitements sec et ozone sec, chez les deux génotypes, on note une biomasse plus faible que le témoin pour les feuilles et les tiges. Chez Robusta, le traitement ozone sec semble avoir un fort impact sur la masse foliaire. Bien qu'on n'observe pas de différences significatives de la masse des feuilles entre le témoin et l'ozone, selon les observations du nombre de feuilles et de leur perte (Tableau 2), les arbres-ozones devraient tendre vers une diminution de la biomasse foliaire par rapport au témoin. Aucune différence significative entre les traitements pour la masse des racines n'est observée. Cependant, on a une tendance à la diminution pour les arbres en sécheresses. Si on observe le rapport racine/tige, on peut voir qu'il est plus élevé chez Robusta que Carpaccio pour tous les traitements. Chez carpaccio, le rapport est impacté par l'ozone, probablement à cause d'une différence au niveau des racines. Chez Robusta, on observe une différence nette entre sec et témoin.

Génotype	Traitement	Feuilles		Tiges		Racine		Racine/Tige					
		Masse fraîche (g)	Masse sèche (g)	Masse fraîche (g)	Masse sèche (g)								
Carpaccio	Témoin	113,41 ±18,85	a	24,32 ±5,75	a	71,63 ±14,71	a	15,61 ±4,30	a	1,93 ±0,66	ns	0,14 ±0,03	a
	Sec	64,42 ±20,91	b	15,52 ±3,48	b	50,91 ±26,03	b	10,63 ±2,81	b	1,51 ±0,61	ns	0,13 ±0,02	ab
	Ozone sec	70,17 ±8,71	b	15,35 ±2,28	b	45,25 ±8,46	b	10,68 ±2,40	b	1,38 ±0,40	ns	0,14 ±0,02	a
	Ozone	96,37 ±15,57	a	20,14 ±4,21	a	71,61 ±14,86	a	15,27 ±4,01	a	1,62 ±0,53	ns	0,11 ±0,02	b
Robusta	Témoin	51,22 ±9,95	a	12,62 ±2,93	a	16,95 ±4,64	a	4,53 ±1,55	a	2,54 ±1,11	ns	0,62 ±0,14	a
	Sec	36,38 ±7,55	bc	9,26 ±2,35	b	12,32 ±2,93	b	3,52 ±1,07	a	1,61 ±0,64	ns	0,47 ±0,08	b
	Ozone sec	33,37 ±9,02	c	8,35 ±2,36	b	12,26 ±3,17	b	3,56 ±1,31	a	1,84 ±0,69	ns	0,55 ±0,24	ab
	Ozone	43,70 ±7,92	ab	10,18 ±2,14	ab	16,86 ±2,96	a	4,51 ±1,14	a	2,57 ±1,30	ns	0,53 ±0,12	ab

Tableau 3 : Effets des différents traitements sur la biomasse fraîche pour les feuilles et tiges, ainsi que sur la masse sèche des feuilles, tiges et racines. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements au seuil de risque de 0,05 %.

2. Suivie des chlorophylles et des échanges gazeux

a) Évolution des chlorophylles totales

Il est bien connu que l'ozone est responsable de dégâts foliaires notamment des décolorations, nettement visibles à l'œil nu. Ainsi, des mesures de chlorophylles ont été réalisées tout au long de la durée des traitements sur les feuilles des deux génotypes. Si on observe l'évolution de la concentration en chlorophylle totale pour les deux génotypes (Figure 4). On voit d'abord une augmentation de la concentration en chlorophylles au cours du temps jusqu'à 2 mg.g⁻¹ de MF à 16 jours pour les traitements contrôle et sec. Alors que pour les traitements ozone et ozone sec l'on observe une diminution des chlorophylles chez Robusta et Carpaccio. Cette diminution est moindre pour le traitement ozone sec avec des concentrations de l'ordre de 1,4 mg.g⁻¹ MF au 16^e jour. Tandis qu'elle est très importante pour l'ozone avec des concentrations de l'ordre de 1 mg.g⁻¹ MF au 16^e jour. Certaines feuilles devenant complètement jaunes avant leur abscission.

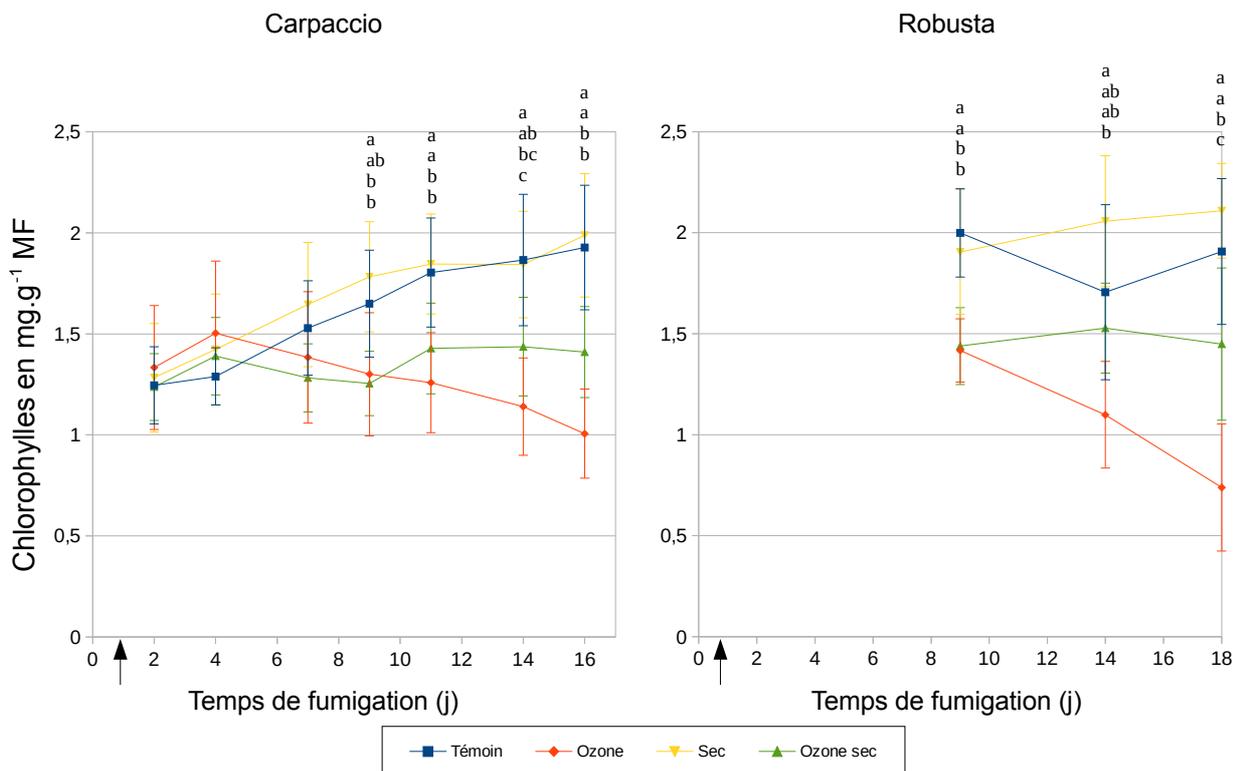


Figure 4 : Effets des différents traitements sur la concentration totale en chlorophylles. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, par traitements (de 2 à 10 jours : $n=8$, de 11 à 17 jours : $n=12$). Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements au seuil de risque de 0,05 %. L'absence de lettre correspond à l'absence de différence significative. La flèche noire marque le début de la fumigation d'ozone pour le lot d'arbre soumis à ce traitement.

b)Échanges gazeux foliaires

Les échanges gazeux ont été mesurés tout au long de la durée des traitements (fig.5). Si l'on s'intéresse tout d'abord à l'assimilation, une diminution de l'assimilation nette de CO_2 est observée au cours du temps pour les deux génotypes, probablement due à un effet d'ombrage causé par la croissance des arbres. En effet, on passe d'environ $8 \text{ nmol de } \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ à environ $5 \text{ nmol de } \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ au cours des 17 jours d'expérimentation. Si on observe plus attentivement l'effet des traitements en fonction des génotypes, on s'aperçoit que pour Carpaccio, aucune différence significative n'apparaît entre les différents traitements, bien qu'une tendance importante à la baisse pour les arbres sous ozone soit observée. La différence est significative seulement avec le traitement sec au 17e jour. Le traitement sec présente la plus forte variabilité de réponse au niveau de l'assimilation. Si on s'intéresse maintenant à la réponse de Robusta, on peut noter une différence au 17e jour entre l'ozone et les 3 autres traitements. Il semblerait que le traitement ozone impact l'assimilation chez Robusta et peut-être chez Carpaccio.

Concernant la conductance stomatique (G_s), on peut observer une diminution de celle-ci chez Carpaccio pour les traitements sec, ozone et ozone sec. On observe la même tendance pour Robusta, avec une diminution de la conductance pour les traitements secs. Mais l'on n'observe pas de différences significatives avec l'ozone seule.

Les deux paramètres, assimilation et conductance stomatique permettent de calculer le rapport A/G_s . Ce rapport donne une information sur l'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée (WUE_i) soit la quantité d'eau utilisée pour une quantité de CO_2 assimilé. Pour les deux génotypes, le WUE_i est plus élevé pour les traitements sec et ozone sec ce qui est finalement attendu avec une assimilation identique au témoin et une conductance stomatique plus faible. On observe l'absence de différence entre les traitements témoin et ozone. Il est à signaler que le WUE_i de Robusta en condition de sécheresse est nettement supérieur à celui de Carpaccio dans les mêmes conditions.

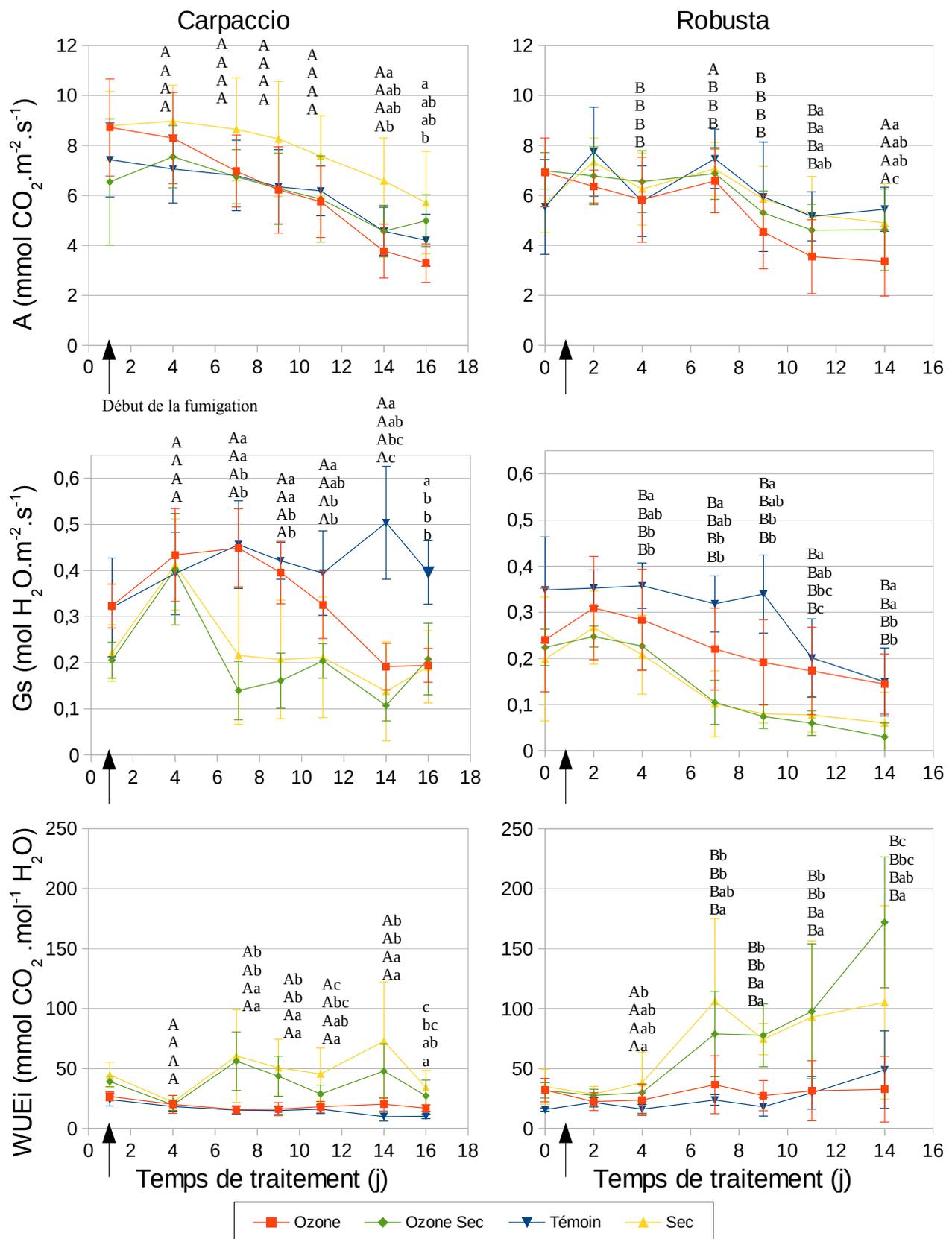


Figure 5 : Effets des différents traitements sur l'assimilation (A), la conductance stomatique (Gs) et l'efficacité d'utilisation de l'eau WUEi des deux génotypes de peuplier. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, par traitements (de 0 à 1 jour : n=4, de 2 à 10 jour : n=8, de 11 à 17 jour : n=12). Les lettres majuscules renvoient aux différences entre génotypes pour un même traitement. Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour le même génotype au risque de 0,05 %. L'absence de lettre minuscule correspond à l'absence de différence significative. La flèche noire marque le début de la fumigation d'ozone pour le lot d'arbre soumis à ce traitement.

3. Symptômes foliaires et cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène

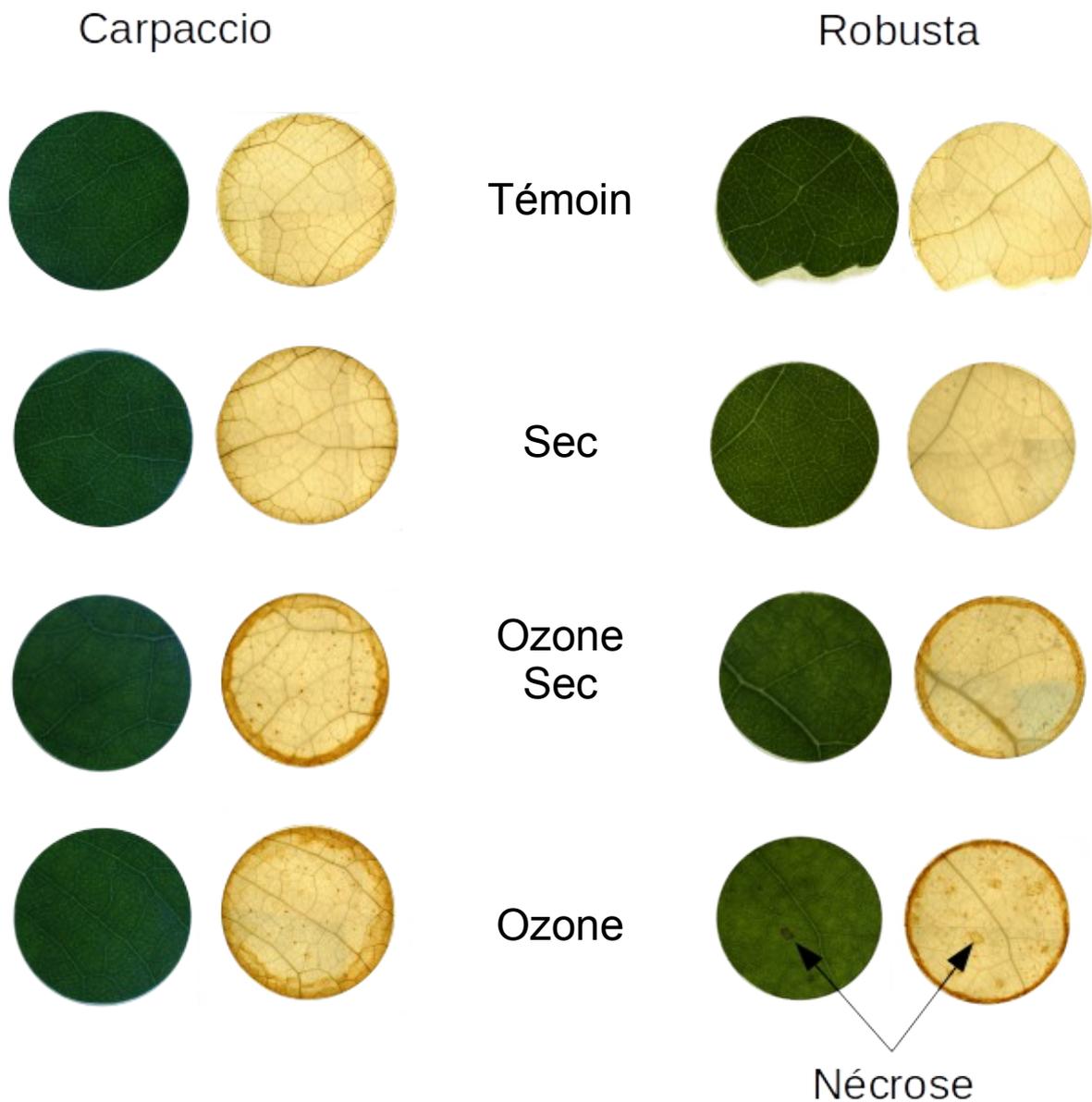


Figure 6 : Cytolocalisation foliaire du peroxyde d'hydrogène par précipitation avec du 3,3'-diaminobenzidine au 13e jour des différents traitements. Les colorations brun-marron indiquent la présence d' H_2O_2 .

Au cours de l'expérimentation, nous avons pu remarquer sur les feuilles de Robusta étaient nettement visibles de petites nécroses, tandis que chez Carpaccio les nécroses sont apparues plus tardivement et de manière moins importante. De plus pour les deux génotypes, seules les feuilles matures étaient atteintes. La cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène (Fig.6) montre une forte présence chez les traitements ozone et ozone sec avec l'apparition de petite tache sur les disques. Avec notamment chez Robusta une présence plus forte pour le traitement ozone notamment au niveau des nécroses présentent lors du prélèvement des feuilles. On note également que pour les traitements ozone, on a une auréole très importante autour des disques dus à la découpe à l'emporte-pièce.

4. Activités enzymatiques : Déhydroascorbate Réductase et Glutathion Réductase

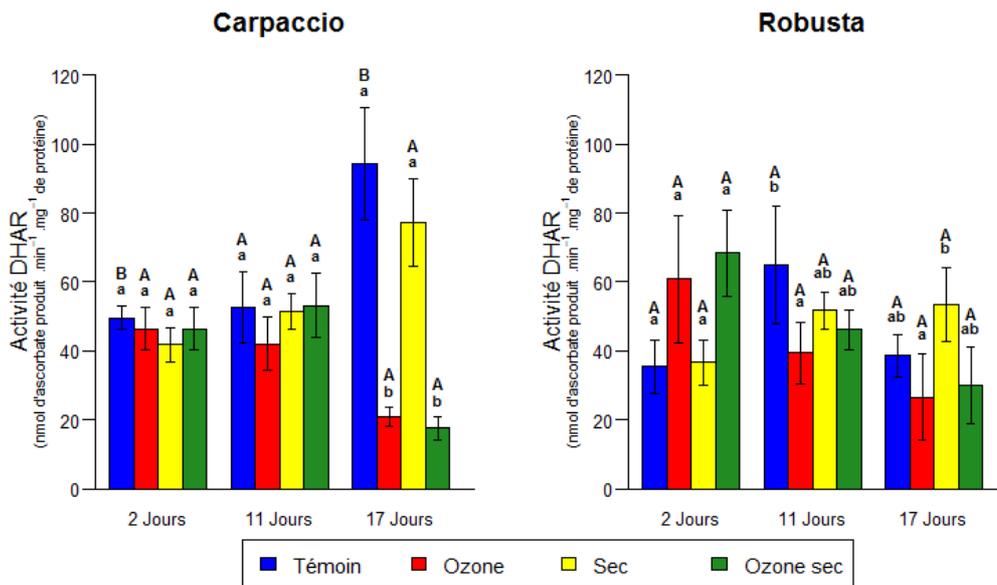


Figure 7 : Effets des différents traitements sur l'activité foliaire de la déhydroascorbate réductase dans les feuilles des deux géotypes. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, de 4 répétitions biologiques. Les lettres majuscules renvoient aux différences entre géotypes pour un même traitement. Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour le même géotype au risque de 0,05 %.

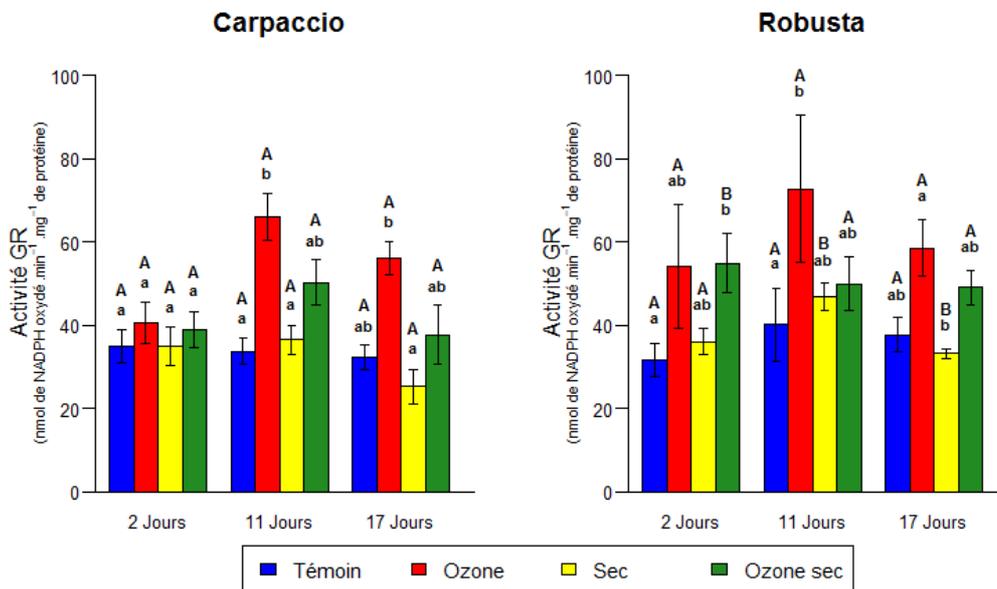


Figure 8 : Effets des différents traitements sur l'activité foliaire de la glutathion réductase dans les feuilles des deux géotypes. Représentation de la moyenne \pm l'écart type, de 4 répétitions biologiques. Les lettres majuscules renvoient aux différences entre géotypes pour un même traitement. Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour le même géotype au risque de 0,05 %.

L'activité déhydroascorbate réductase (DHAR) a été mesurée dans les feuilles à différents temps au cours de l'expérience (Fig.7), on peut voir une différence de l'activité DHAR entre les génotypes pour le contrôle à 2 jours et 17 jours. Pour Carpaccio, on note une augmentation de l'activité à 17 jours pour le contrôle, on a un doublement de l'activité DHAR, alors que pour Robusta, l'activité augmente à 11 jours avant de redescendre le 17^e jour au même niveau que le 2^e jour. Pour les autres traitements, on observe une forte diminution de l'activité pour les traitements ozones chez Carpaccio, 3 fois moins que le témoin à 17 jours. Tandis que pour Robusta, les activités à 17 jours des traitements ozone et ozone sec bien que plus faible que le témoin ne sont pas significativement différentes. Il est cependant assez intéressant d'observer que pour le traitement sec seul, l'activité DHAR ne diminue pas par rapport au contrôle au cours du temps.

L'activité glutathion réductase (GR) a également été mesurée dans les feuilles (Fig. 8). Pour Carpaccio, l'activité de la GR au 2^e jour est identique pour tous les traitements. Au 11^e jour, on observe une augmentation de l'activité pour le traitement ozone, 2 fois celle du témoin, qui est maintenue au 17^e jour. De plus, le traitement sec ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de la GR. Pour Robusta, l'on observe le même profil de stimulation de l'activité. Cependant, l'augmentation pour le traitement ozone à lieu dès le 2^e jour et ceux pour les deux traitements ozone et ozone sec avec des niveaux d'activité identique.

5. Expression de gènes : Déhydroascorbate Réductase et Glutathion Réductase

Le niveau d'expression des gènes codant les différentes isoformes de glutathion réductase (*GR2*, *GRA* et *GRB*) et une isoforme de déhydroascorbate réductase (*DHAR3*) a été déterminé pour le temps 2 de l'expérimentation relativement à leur expression pour les échantillons témoin (Fig.9). Au moins deux autres isoformes fonctionnelles de DHAR (*DHAR1* et *DHAR2*) ont été caractérisées chez le peuplier (Tang et Yang, 2013) mais par manque de temps, nous n'avons pu analyser l'expression des gènes qui les codent. L'analyse de nos résultats montrent que selon les traitements et les génotypes, plusieurs tendances semblent se dégager (sous réserve d'analyses statistiques ultérieures). Ainsi, chez Carpaccio, il semblerait que les différents traitements soient responsables d'une légère tendance sous-expression de *GR2*. Une tendance à la sous-expression de *GRB* est également observée pour les traitements ozone et sec, mais aucun effet sur le traitement combiné. Enfin, il semblerait qu'une tendance à la sous-expression de *GRA* se dégage pour le traitement sec alors qu'aucun effet des traitements ozone et ozone sec n'est observé. De plus pour tous les traitements, aucunes différences par rapport au témoin semblent apparaître pour l'expression de *DHAR3*.

Pour Robusta, on ne retrouve pas cet effet de la sécheresse pour *GRA* alors que les traitements ozone et ozone sec semblent provoquer une sur-expression de *GRA*, qui double sa quantité relative de transcrit par rapport au témoin. On observe également un effet de ces deux traitements sur *GR2*, ou l'on observe une diminution de l'expression avec notamment pour le traitement ozone sec un niveau d'expression intermédiaire à celui obtenu pour le traitement ozone. Contrairement à Carpaccio, chez Robusta, le traitement ozone semble avoir un effet sur l'expression de *DHAR3*, avec une légère sur-expression. Et finalement chez Robusta, aucun d'effet des traitements ozone et ozone sec est observé sur l'expression de *GRB* par contre une légère sous-expression semble apparaître pour le traitement sec.

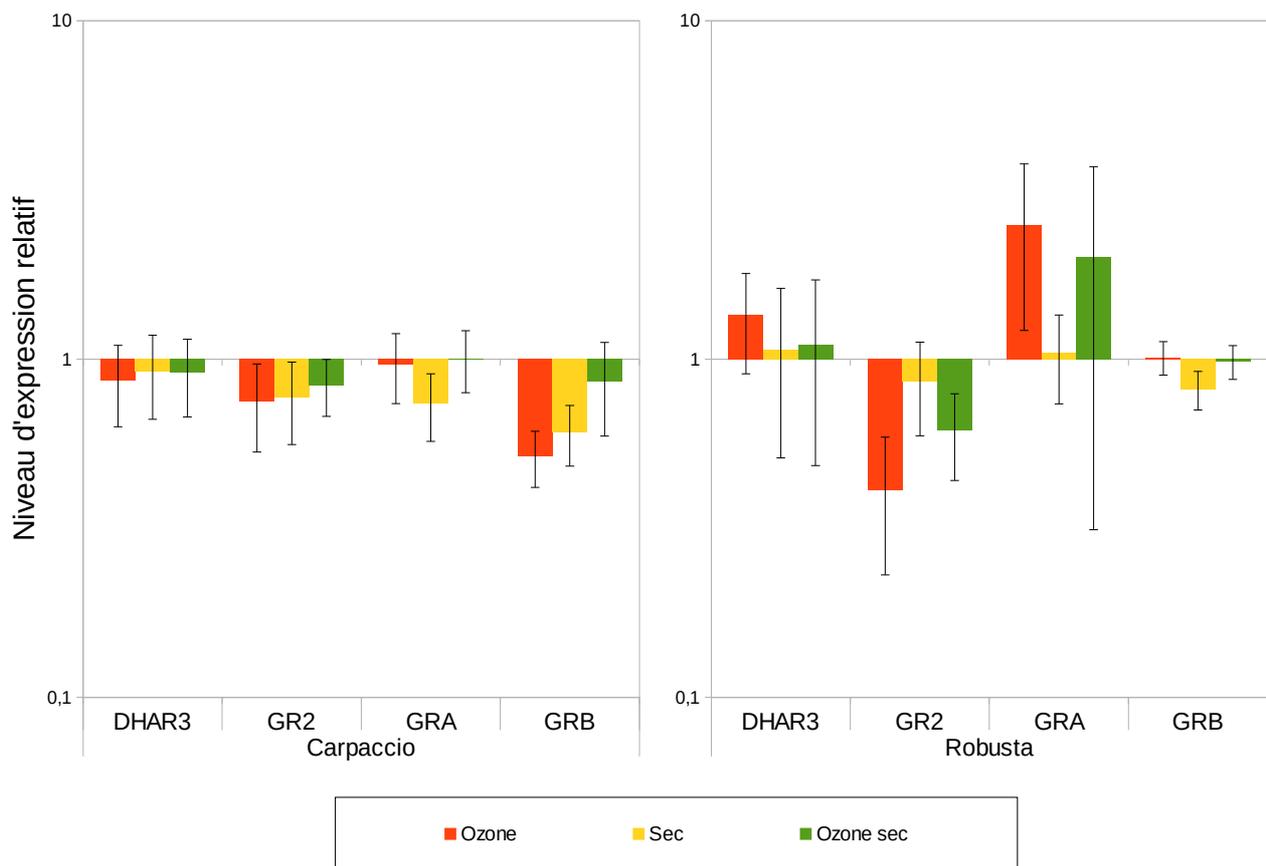


Figure 9 : Niveau d'expression foliaire de *DHAR3*, *GR2*, *GRA*, *GRB* mesuré par RT-qPCR pour chaque génotype de peuplier au temps 2 de l'expérience. L'expression de chaque gène est relative à celle de *GUT1* et à l'expression de chaque gène pour le témoin (définie à 1). Représentation de la moyenne \pm l'écart type de 4 répétitions biologiques.

Discussion

Dans la littérature, il existe un certain nombre de travaux sur les effets de l'ozone ou de la sécheresse chez les végétaux. Alors que peu de travaux combinent l'effet des deux stress sur le peuplier. De plus, l'étude d'un seul stress est un exercice compliqué en soi car la tolérance à un stress est un trait multigénique, dépendant des interactions du génome et de l'environnement. Pour rappel, les deux génotypes de *Populus* euraméricain, Carpaccio et Robusta, ont été sélectionnés pour leur différence de sensibilité à l'ozone définie par des différences de symptômes foliaires. Par ailleurs, Carpaccio est un génotype avec une forte productivité et considéré comme tolérant à la sécheresse (Cohen et al., 2010 ; Monclus et al., 2006) et à l'ozone (Dghim et al., 2012 ; Dumont et al., 2014). Robusta a une plus faible productivité que Carpaccio, en accord avec nos résultats de biomasse et la littérature (Monclus et al., 2006 ; Dumont, 2013), mais sa tolérance à la sécheresse n'était pas encore connue jusqu'ici.

1. Effet des stress sur le développement et réponses écophysologiques

a) Deux génotypes tolérants à la sécheresse ?

La variabilité de tolérance à la sécheresse est très importante au sein des différents génotypes de peuplier (Monclus et al., 2006). De plus, la tolérance à la sécheresse peut être considérée de deux points de vue : la survie (réduction de l'utilisation d'eau par réduction de la croissance de la tige et une meilleure détoxification) ou le maintien de la productivité (Yang et al., 2009). Dans notre cas, on observe une diminution de la croissance par rapport au témoin pour les

deux géotypes confrontés à un manque d'eau. Si l'on prend également en compte la biomasse des deux géotypes, la diminution de masse racinaire, qui est nettement marquée chez Robusta, pourrait permettre de limiter la consommation d'eau et donc l'évapotranspiration. Et la diminution du rapport racine/tige et un argument supplémentaire pour la tolérance d'un arbre à la sécheresse (Regier et al., 2009). Mais il faut prendre en considération un éventuel « effet pot » qui pourrait influencer sur l'interprétation (Regier et al., 2009), sachant que pour les arbres-contrôles, le développement des racines était nettement limité par la taille du pot. De plus, du fait de leur différence de développement, il est possible que les deux géotypes ne perçoivent pas le stress avec la même intensité. Carpaccio a une surface d'échanges plus importante avec l'environnement d'où peut-être la diminution plus importante de sa croissance radiale, 10 % plus importante que Robusta, qui pourrait par exemple pourrait être due à un phénomène de cavitation plus important. Il est difficile de comparer les deux géotypes du fait de leur productivité différente. En effet le compromis entre survie et productivité chez les deux géotypes peut être différent.

Pour ce qui est des échanges gazeux, on observe bien chez les deux géotypes et au cours du temps, une diminution de la conductance stomatique due à la sécheresse, et à la limitation de transpiration. Pour les deux géotypes, on n'observe pas de différence significative d'assimilation avec le témoin. Les deux peupliers sont donc capables de maintenir leur capacité photosynthétique lors d'un stress hydrique causé par la sécheresse. Des résultats différents, ont été observés sur Carpaccio (Cohen et al., 2010), avec une diminution de moitié de l'assimilation, mais l'expérience aurait été réalisée sur des arbres cultivés et plantés sur un substrat différent (sable et tourbe). Cependant, si dans nos résultats on s'intéresse à l'efficacité d'utilisation de l'eau, on observe une efficacité plus élevée pour Robusta que pour Carpaccio. Or, les arbres à forte efficacité d'utilisation de l'eau et faible productivité sont plus résistants à la sécheresse (Monclus et al., 2006 ; Regier et al., 2009). Ainsi, d'un point de vue réponses écophysiologicals, les deux géotypes semblent être tolérants à une sécheresse modérée, avec une stratégie de survie. Le fort WUEi de Robusta pourrait indiquer qu'il est plus résistant ou bien du fait d'une productivité plus faible, simplement prédisposé à moins percevoir le stress. Cependant, il est possible que les deux géotypes diffèrent par leur capacité de détoxification face aux stress oxydants sous sécheresse.

b) Des dégâts foliaires différents, mais une réponse identique à l'ozone

En accord avec Dghim et al. (2012) et Dumont (2013), nous retrouvons des différences de symptômes foliaires entre les deux géotypes, Robusta étant plus touché par les nécroses que Carpaccio. Cependant, nos résultats présentent des différences avec leurs résultats. Notamment au niveau du pourcentage de feuille perdue par rapport au témoin ne semblent pas être différent entre Carpaccio et Robusta (respectivement 30 et 32%) et Chez carpaccio, l'on n'observe pas de différence de croissance entre le témoin et l'ozone, contrairement à l'augmentation de croissance sous ozone observée par Dumont (2013).

Sous ozone, on retrouve bien une tendance à la diminution de l'assimilation et une perturbation de l'ouverture stomatique. On observe une fermeture des stomates précédemment mise en évidence chez nos géotypes (Dumont, 2013), bien que pour d'autres géotypes de peuplier, l'on observe une augmentation de Gs (Bohler, 2010 ; Di Baccio et al., 2008). Ces différences de sensibilité sont peut-être fortement liées à la sensibilité des géotypes utilisés et marquent la capacité des plants tolérants de fermer leurs stomates de manière active à l'opposé des plants sensibles dont le contrôle de la Gs est fortement perturbé. La forte variabilité liée au génome de peuplier est là encore un facteur important. De plus, aucune différence de comportement n'est observée entre nos deux géotypes puisque tous les deux ferment leurs stomates. Toutefois, Dumont (2013) avait observé des différences de conductance stomatique entre les deux géotypes, Robusta fermant moins vite ses stomates que Carpaccio. La conductance stomatique étant un paramètre très sensible à l'arrosage, il est possible que lors de notre expérimentation du fait du traitement sec, les arrosages aient été

réalisés de manière plus régulière et plus précise. Un léger décalage dans le temps entre la période d'arrosage et la mesure pouvant fortement impacter la Gs. Les différences observées au niveau de l'assimilation sont probablement et principalement dues à la hauteur de la feuille considérée et à la différence de taille au début des traitements entre les 2 arbres. En effet, la 10^e feuille de Carpaccio était plus haute que celle de Robusta. En comparaison le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) était plus élevé. La différence de productivité et donc de taille de nos 2 génotypes est encore une fois un obstacle à l'interprétation des différences de sensibilité. Sur les feuilles ayant servi aux mesures des échanges gazeux, on a observé une diminution importante du contenu en chlorophylles. Il est possible que la diminution d'assimilation observée soit due à une diminution importante des chlorophylles nécessaires à la photosynthèse. L'altération des chlorophylles dans les feuilles mature étant souvent observé lors d'une exposition à l'ozone et également associée à la diminution de la Rubisco (Wittig et al., 2009).

c) Différence de sensibilité au stress combiné

Pour le stress combiné, on observe les mêmes effets que le traitement sec pour la diminution de croissance et de biomasse. Cependant pour Robusta, une chute des feuilles aussi importante que le traitement ozone est observée. Alors que pour Carpaccio, la chute des feuilles entre le traitement sec et ozone sec, est identique. Chez les deux génotypes, il est intéressant d'observer que l'impact sur les chlorophylles est moins important sous ozone en présence de la sécheresse. En effet la concentration en chlorophylles totales pour le traitement combiné est plus élevée que celle du traitement ozone. Ceci peut être dû à la diminution de l'entrée de l'ozone causé par la fermeture des stomates en conditions de sécheresse. Il serait intéressant d'évaluer le flux d'ozone par rapport à la conductance stomatique, de manière à connaître l'exposition effective chez les deux génotypes et en fonction des différents traitements. Par exemple, à l'aide du calcul du POD_Y (Dose phytotoxique d'ozone au-dessus d'un flux-seuil de $Y \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En ce sens, il est possible que la sécheresse protège effectivement l'arbre des dégâts de l'ozone, cependant, l'arbre subit les dégâts dus à la sécheresse. Dans le cas de Robusta, le traitement combiné pourrait avoir un effet synergique, puisque l'arbre subit plus de pertes. Les pertes de biomasse dues à la sécheresse plus les pertes de feuilles dues à l'ozone. D'un point de vue productivité (biomasse et feuille), le traitement combiné a un impact plus fort. Il serait néanmoins intéressant de savoir si les arbres en traitement combiné se rétablissent mieux après un « retour à la normale ». Tandis que pour Carpaccio, on aurait plutôt un effet antagoniste des deux stress, la sécheresse limitant le stress ozone.

2. Stress, détoxification et génome

Bien que l'on observe le même type de réponse de nos arbres du point de vue du développement et des échanges gazeux. Robusta semblent être plus sensible à l'ozone vis-à-vis des dégâts foliaires, et ce même en présence de la sécheresse. Alors que d'après nos résultats de biomasse et de WUE_i , il est peut-être plus résistant à la sécheresse. Il est possible que les mécanismes de détoxification diffèrent entre les deux arbres et entre les deux types de stress.

a) Induction de la détoxification, un effet traitements

Les résultats de coloration au DAB indiquent une plus forte production de peroxyde d'hydrogène en présence d'ozone. Les auréoles apparues en bordure des disques foliaires des traitements ozone et ozone sec, suggèrent une plus grande sensibilité à la blessure ou peut-être un système de production d' H_2O_2 plus efficace. Il est dommage de ne pouvoir déterminer les différences de concentration en peroxyde d'hydrogène par la méthode de cytolocalisation au DAB. Il pourrait être envisageable d'utiliser des outils d'imagerie afin de quantifier la surface de coloration ; ainsi, des informations sur les différences de production de peroxyde d'hydrogène entre le traitement ozone et le stress combiné pourraient être obtenues. Cela pourrait permettre de vérifier ce qui est observé à l'œil nu. Chez Robusta, l'observation des nécroses révèle nettement qu'en traitement combiné, moins de nécroses sont visibles par rapport aux feuilles ayant été fumigées à

l'ozone seul. Bien que nous n'ayons pas d'informations concernant les autres ROS potentiellement produits dans les cellules lors de ces différents types de stress, il serait possible que le stress oxydant induit par l'ozone (particulièrement à 120 ppb) soit bien supérieur à celui produit par la sécheresse. De plus, à l'intérieur de la cellule, suivant le traitement (sécheresse ou ozone), le stress oxydant engendré peut ne pas être localisé dans le même compartiment. La production endogène de ROS lors de la sécheresse devrait localiser le stress principalement au niveau des chloroplastes et mitochondries, prédisposés à la fuite d'électrons. Alors que dans le cas de l'ozone, le stress oxydant intracellulaire serait ubiquiste (Iriti et Faoro, 2007). Par ailleurs, la GR et la DHAR étant fortement impliquées dans la défense contre le stress oxydant, étant donné leur rôle dans le maintien des pools d'ascorbate et de glutathion réduits par rapport aux pools oxydés (Mittler, 2002) nous nous sommes intéressés à leur activité enzymatique respective. Alors que pour les deux génotypes de peuplier, et pour les deux enzymes, aucune modification d'activité ne semble causée par le traitement sec, les traitements ozone et ozone sec induisent, quant à eux, des augmentations d'activité. Ceci représente un argument supplémentaire qui suggère une différence de stress oxydant entre les traitements. Pour la sécheresse, la stimulation de l'activité GR et DHAR a été observée chez différentes espèces : le caféier (Pinheiro et al., 2004) et le pommier (Wang et al., 2012). Pour le pommier, il a été montré que les arbres tolérants à la sécheresse avaient un niveau constitutif d'enzyme plus élevé que les arbres sensibles (Wang et al., 2012). Nos conditions de sécheresse étaient moins sévères que celles de ces études car nous avons maintenu un niveau d'humidité « constant » avec des arrosages réguliers, et non un arrêt complet d'arrosage. L'absence de stimulation de l'activité de ces enzymes sous sécheresse dans notre expérience pourraient être dues à nos conditions de sécheresse et la tolérance de nos génotypes.

De plus, l'analyse de l'expression de gènes au second jour des traitements nous révèle également, pour les différents traitements et génotypes, une différence d'induction de la transcription de certains gènes codant des isoformes de ces enzymes impliquées dans la détoxification (GR et DHAR). En effet, chez Carpaccio on observe un effet sur *GRA* seulement observé en traitements sec. Alors que chez Robusta, en traitement sec, on observe cette fois un effet sur le gène *GRB* ; tandis que les traitements ozone et ozone sec n'ont pas d'effet sur ce gène. Il semblerait donc qu'en fonction des traitements, nos arbres réagissent différemment au stress oxydant généré. Et, une fois encore, nos résultats concernant les niveaux d'expression des gènes semblent montrer, au moins pour *GRB* chez Carpaccio et *GR2* et *GRA* chez Robusta, que le stress combiné ozone sec a une réponse que l'on peut qualifier d'« intermédiaire » par rapport à la réponse obtenue pour le traitement ozone seul et le traitement sec seul.

b) Différence de sensibilité à l'ozone, une détoxification différente ?

Avec un niveau intermédiaire de la GR pour le traitement combiné de carpaccio. Si en condition de sécheresse, les arbres subissent un stress oxydant dû à l'ozone moins important grâce à la fermeture des stomates, peut être que ce stress est déjà la limite de ce que peut supporter Robusta. Carpaccio peut être capable de supporter une dose plus importante d'ozone que Robusta. Les capacités de détoxification de Robusta pourraient très vite être saturées comparé à Carpaccio. L'activité DHAR plus importante à deux jours chez Robusta pourrait indiquer une oxydation plus importante du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG), mais également une meilleure réduction de l'ascorbate. L'augmentation de l'activité de la GR chez les deux génotypes semblerait indiquer une réduction plus importante de la GSSG en GSH pendant le traitement ozone. Et cette activité semble plus importante chez Robusta que chez Carpaccio. Pour le présent rapport, nous n'avons pas eu le temps de doser les pools d'ascorbate et de glutathion. Malgré cela, d'après les travaux précédemment réalisés par Dumont et al. (2014) la concentration totale en glutathion et ascorbate augmente progressivement et significativement chez les deux génotypes lors de l'exposition à l'ozone. De plus, chez Carpaccio, on note une augmentation de l'ascorbate réduit. Tandis que chez Robusta on a une augmentation de l'ascorbate oxydé. Carpaccio, le génotype le plus résistant a donc une meilleure capacité de régénération de l'ascorbate que Robusta qui n'est pas

capable de le régénérer de manière efficiente. Nos résultats ne sont pas en accord avec l'évolution des pools d'ascorbate et de glutathion réduit et oxydé déjà observés dans les mêmes conditions. La meilleure détoxification observée chez Carpaccio peut provenir simplement de la meilleure biosynthèse de l'ascorbate et du glutathion (Dumont et al., 2014). Mais, il est possible que la différence observée provienne de l'activité d'autres enzymes telles, les glutathions *S*-transférase (GST), les glutarédoxines (GRX) et les peroxyredoxines (PRX) provoquent aussi l'oxydation du glutathion (Rahantaniaina et al., 2013). De plus, Robusta ayant une moins bonne régénération de son pouvoir réducteur que Carpaccio (Dghim et al., 2012). Comme évoquée précédemment, la défense antioxydante de Robusta peut très vite être dépassée par l'intensité et la durée du stress par comparaison avec Carpaccio et la forte productivité de Carpaccio pourrait être responsable d'une meilleure maintenance.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'expression des gènes de la GR et de la DHAR. Pour le présent rapport, seules les données pour le 2^e jour ont pu être acquises. Malgré cela, l'on observe quand même des différences d'expression entre les traitements et les génotypes sur ce temps court. Il est intéressant de voir que pour le traitement ozone, chez Carpaccio, on a une tendance à la sous-régulation de l'expression de certains gènes *GR*. Tandis que pour Robusta, on observe une expression différente de ces mêmes gènes. L'ozone induisant une sous-expression de *GR2* et une sur-expression de *GRA* et de la *DHAR*. Les tendances observées pour l'expression des gènes montrent, comme pour les activités enzymatiques, que Robusta réagit plus tôt au stress.

Au vu de nos résultats d'expression génique, un rôle distinct des trois isoformes de GR étudiées semble se dessiner dans la réponse du peuplier aux différents traitements. Robusta, génotype caractérisé comme plus sensible à l'ozone, semblerait induire, dès 2 jours de traitement ozone, la surexpression de *GRA*, alors que *GR2* est quant à lui sous-exprimé et qu'aucune variation d'expression est observée pour *GRB*.

Ces différences d'expression observées pourraient provenir de la différence de localisation des différentes isoformes de *GR* (Tableau 1). En effet, la protéine issue de la traduction du transcrit *GR2* est localisée dans les chloroplastes tandis que celles codées par les gènes *GRA* et *GRB* sont localisées dans le cytoplasme. La régénération de l'ascorbate réduit ayant lieu dans le cytosol (Fig. 1), il est possible que l'augmentation de l'expression de *GRA* chez Robusta soit stimulée pour contrer le stress oxydant d'abord induit dans l'apoplasme par l'ozone et l'augmentation de la l'ascorbate oxydé (DHA) dans le cytosol. Il est intéressant de noter que chez Carpaccio ce soit plutôt *GRB*, elle aussi cytosolique, qui semble impliquée dans la réponse au stress oxydant. Par ailleurs, il a été montré, chez le peuplier, que les gènes codant une isoforme cytosolique et une isoforme chloroplastique de GR voyaient leur expression induite en présence d'un stress abiotique causé par un excès de zinc (Di Baccio et al., 2005).

Par ailleurs, l'augmentation d'expression de *DHAR3* chez Robusta sous traitement ozone, souligne l'implication de cette isoforme dans la réponse de Robusta au stress oxydant. Or, notre *DHAR3* est homologue à un gène *DHAR* observé chez *Populus tomentosa*, codant pour une DHAR fonctionnelle ayant une localisation cytosolique (Tang et Yang, 2013). Une augmentation de la tolérance au stress ozone et sécheresse a été observée sur des mutants de tabac qui sur-exprime une DHAR cytosolique (Eltayeb et al., 2006). De même, chez *Arabidopsis*, une exposition de 24h à 200 ppb d'ozone induit l'expression du gène codant pour l'isoforme cytosolique de DHAR (Yoshida et al., 2006). L'expression des gènes codant les deux autres isoformes de DHAR d'*Arabidopsis*, respectivement chloroplastique et mitochondriale, n'étant pas induite sous ozone (Yoshida et al., 2006). De plus, dans cette même étude, il a été montré qu'un mutant déficient en activité DHAR cytosolique était hautement sensible à l'ozone (Yoshida et al., 2006), révélant l'importance de l'isoforme cytosolique dans la résistance à l'ozone.

Le fait que l'on n'observe pas de réponses fortes chez Carpaccio pourrait provenir d'un niveau constitutif de GR et DHAR suffisant pour pallier le stress oxydant à un temps court. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera intéressant de corréliser nos résultats d'expression de gènes à l'analyse (en cours au laboratoire) par Western blot de la quantité de protéines DHAR et GR présentes dans nos échantillons. Malheureusement, les anticorps utilisés ne permettent pas de discriminer les différentes isoformes, et la réponse, pour chaque enzyme, sera donc globale. Par ailleurs, il est possible que l'expression de gènes de Carpaccio après 11 jours de traitements soit différente de celle obtenue après 2 jours, ce qui pourrait suggérer une réponse décalée.

Conclusion et Perspectives

La différence de sensibilité à l'ozone de nos deux génotypes est basée sur une différence de symptômes foliaires. En effet, Robusta est plus atteint que Carpaccio. Mais aux vues des résultats la différence de sensibilité observée pourrait être due principalement à la réponse de détoxification et à un effet dose/exposition. Il serait intéressant de voir quel arbre est le plus résilient face au stress, que ce soit à l'ozone ou à la sécheresse.

Du fait de la forte différence de productivité entre les génotypes due à leur différence de croissance, les deux génotypes étaient à des stades de développement très différents, qui peuvent biaiser le rapport au stress. Au même âge, Carpaccio possède une surface d'échange avec l'environnement nettement supérieure à Robusta, ce qui peut fortement influencer la perception du stress, car ainsi, il peut recevoir plus d'ozone et transpirer plus d'eau que Robusta. Par exemple pour les mesures d'échanges gazeux, il y avait des différences d'ombrage entre les génotypes.

Concernant les mesures d'échanges gazeux, il serait pertinent de connaître les modifications de respiration en fonction du stress. Dans le cas du traitement ozone, il est possible que les dégâts subis au niveau des chloroplastes dans les feuilles ne permettent plus un apport suffisant de NAD(P)H, pouvoir réducteur essentiel au fonctionnement du cycle ascorbate-glutathion. Pour compenser cela, la respiration des arbres peut être augmentée et des différences entre les génotypes et les traitements pourraient être observées.

Comme souligné précédemment, il serait intéressant de savoir où est localisé le stress entre les différents traitements. Pour cela, une localisation des ROS pour chaque stress pourrait être réalisée, par exemple à l'aide d'une sonde 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) en microscopie confocale.

Et finalement, il faudrait compléter le présent rapport par i) l'analyse de l'expression des gènes *DHAR1* et *DHAR2* codant les deux autres isoformes de DHAR dont la localisation prédite in silico est chloroplastique et mitochondriale, respectivement ; ii) le dosage des pool de glutathion réduits et oxydés ; et iii) l'expression des gènes aux 11^{ème} et 17^{ème} jours de traitements, ce qui fournirait des informations sur la réponse des arbres aux différents traitements pour un temps intermédiaire et un temps long. De plus, pour le moment, l'expression relative de nos gènes d'intérêt a été quantifiée par rapport au gène de référence GUT1. D'autres gènes de référence doivent être testés afin de déterminer le plus stable (logiciel Genorm), et celui-ci sera utilisé ultérieurement.

Présentement, nos résultats semblent indiquer que la glutathion réductase cytosolique pourrait être un élément clé des réponses de détoxification mises en place lors d'une exposition à l'ozone.

Pour aller plus loin dans la compréhension des processus impliqués dans la réponse des arbres à la sécheresse et à l'ozone, il serait intéressant d'étudier ces effets en milieu naturel, sur des arbres plus âgés. Des arbres « mature » permettraient de limiter les différences de développement. L'étude en milieu extérieur permettrait, dans un second temps, d'approfondir notre connaissance des systèmes de détoxification mis en place par les plantes confrontées à de multiples stress.

L'identification des éléments clés impliqués dans les adaptations environnementales devrait, à terme, améliorer la connaissance des systèmes de détoxification et la réponse des arbres aux stress abiotiques.

Références bibliographiques

ALLEN, C., MACALADY, A., CHENCHOUNI, H., BACHELET, D., MCDOWELL, N., VENNETIER, M., KITZBERGER, T., RIGLING, A., BRESHEARS, D., HOGG, E. H. et OTHERS, 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*. 2010. Vol. 259, n° 4, p. 660–684.

ASADA, K., 1984. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in enzymology*.

Disponible à l'adresse : <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302540780>

BOHLER, S., 2010. *Les effets de l'ozone sur les processus foliaires du peuplier : une approche protéomique*. Nancy 1.

CASTAGNA, A. et RANIERI, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution*. mai 2009. Vol. 157, n° 5, p. 1461-1469. DOI 10.1016/j.envpol.2008.09.029.

COHEN, D., BOGEAT-TRIBOULOT, M., TISSERANT, E., BALZERGUE, S., MARTIN-MAGNIETTE, M., LELANDAIS, G., NINGRE, N., RENOU, J., TAMBY, J., LE THIEC, D. et OTHERS, 2010. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC genomics*. 2010. Vol. 11, n° 1, p. 630.

DAUDI, A. et O'BRIEN, A., 2012. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol*. 9 février 2012. Disponible à l'adresse : <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=%20263>

DE GARA, L., LOCATO, V., DIPIERRO, S. et DE PINTO, M., 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. août 2010. Vol. 173, p. S13-S19. DOI 10.1016/j.resp.2010.02.007.

DGHIM, A., DUMONT, J., HASENFRATZ-SAUDER, M., DIZENGREMEL, P., LE THIEC, D. et JOLIVET, Y., 2012. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 2012.

DI BACCIO, D. CASTAGNA, A., PAOLETTI, E., SEBASTIANI, L. et RANIERI, A., 2008. Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree physiology*. 2008. Vol. 28, n° 12, p. 1761–1772.

DI BACCIO, D., KOPRIVA, S., SEBASTIANI, L., RENNENBERG, H., 2005. Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? *New Phytologist*, 167, 73-80.

DIXON, M., LE THIEC, D. et GARREC, J., 1998. Reactions of Norway spruce and beech trees to 2 years of ozone exposure and episodic drought. *Environmental and Experimental Botany*. 1998. Vol. 40, n° 1, p. 77–91.

DUMONT, J., 2013. *Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxification foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation*. S.l. : Université de Lorraine.

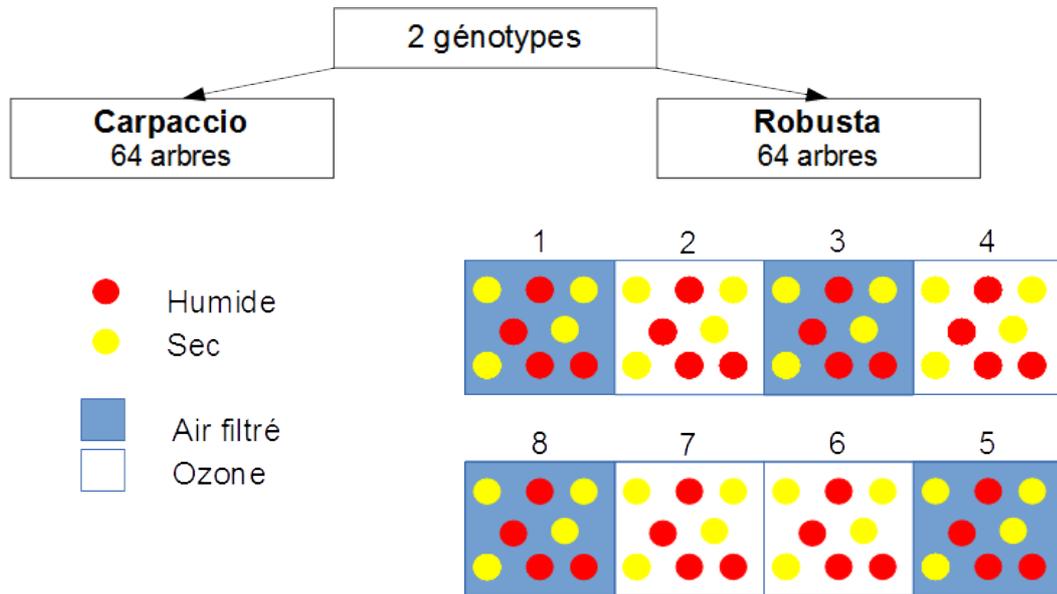
DUMONT, J., KESKI-SAARI, S., KEINÄNEN, M., COHEN, D., NINGRE, N., KONTUNEN-SOPPELA, S., BALDET, P., GIBON, Y., DIZENGREMEL, P., VAULTIER, M. et OTHERS, 2014. Ozone affects ascorbate and glutathione biosynthesis as well as amino acid contents in three

- Euramerican poplar genotypes. *Tree physiology*. 2014. Vol. 34, n° 3, p. 253–266.
- EDREVA, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2 avril 2005. Vol. 106, n° 2–3, p. 119-133. DOI 10.1016/j.agee.2004.10.022.
- ELTAYEB, A., KAWANO, N., BADAWI, G., KAMINAKA, H., SANEKATA, T., MORISHIMA, I., SHIBAHARA, T., INANAGA, S. et TANAKA, K., 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiologia Plantarum*. 2006. Vol. 127, n° 1, p. 57–65.
- FOYER, C. et HALLIWELL, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976. Vol. 133, n° 1, p. 21–25.
- FOYER, C. et NOCTOR, G., 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 2011. Vol. 155, n° 1, p. 2–18.
- GUTIERREZ, L., MAURIAT, M., GUÉNIN, S., PELLOUX, J., LEFEBVRE, J., LOUVET, R., RUSTERUCCI, C., MORITZ, T., GUERINEAU, F., BELLINI, C. et OTHERS, 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant biotechnology journal*. 2008. Vol. 6, n° 6, p. 609–618.
- HALLIWELL, B. et GUTTERIDGE, J., 1989. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*. 1989. Vol. 186, p. 1–85.
- HOSSAIN, M. et ASADA, K., 1984. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and cell physiology*. 1984. Vol. 25, n° 7, p. 1285–1295.
- IPCC, 2013: STOCKER, T.F., QIN, G.-K. PLATTNER, M. TIGNOR, S.K. ALLEN, J. BOSCHUNG, A. NAUELS, Y. XIA, V. BEX AND P.M. MIDGLEY (eds.), 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- IRITI, M. et FAORO, F., 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water, Air, and Soil Pollution*. 29 novembre 2007. Vol. 187, n° 1-4, p. 285-301. DOI 10.1007/s11270-007-9517-7.
- KRONFUß S, G., POLLE, A., TAUSZ, M., HAVRANEK, W. M. et 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*. 1998. Vol. 12, n° 8, p. 482–489.
- LAISK, A., KULL, O. et MOLDAU, H., 1989. Ozone Concentration in Leaf Intercellular Air Spaces Is Close to Zero 1. *Plant Physiology*. juillet 1989. Vol. 90, n° 3, p. 1163-1167.
- MATYSSEK, R., WIESER, G., CALFAPIETRA, C., DE VRIES, W., DIZENGREMEL, P., ERNST, D., JOLIVET, Y., MIKKELSEN, T.N., MOHREN, G.M.J., LE THIEC, D., TUOVINEN, J.-P., WEATHERALL, A. et PAOLETTI, E., 2012. Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environmental Pollution*. janvier 2012. Vol. 160, p. 57-65. DOI 10.1016/j.envpol.2011.07.007.
- MONCLUS, R., DREYER, E., VILLAR, M., DELMOTTE, F. M., DELAY, D., PETIT, J., BARBAROUX, C., LE THIEC, D., BRÉCHET, C. et BRIGNOLAS, F., 2006. Impact of drought on

- productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist*. 2006. Vol. 169, n° 4, p. 765–777.
- OLTMANS, S. J., LEFOHN, A. S., SHADWICK, D., HARRIS, J. M., SCHEEL, H. E., GALBALLY, I., TARASICK, D. W., JOHNSON, B. J., BRUNKE, E.-G., CLAUDE, H. et OTHERS, 2013. Recent tropospheric ozone changes—A pattern dominated by slow or no growth. *Atmospheric Environment*. 2013. Vol. 67, p. 331–351.
- PINHEIRO, H., DAMATTA, F., CHAVES, A., FONTES, E. et LOUREIRO, M., 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant science*. 2004. Vol. 167, n° 6, p. 1307–1314.
- POLLASTRINI, M., DESOTGIU, R., CAMIN, F., ZILLER, L., GEROSA, G., MARZUOLI, R. et BUSSOTTI, F., 2014. Severe drought events increase the sensitivity to ozone on poplar clones. *Environmental and Experimental Botany*. avril 2014. Vol. 100, p. 94-104. DOI 10.1016/j.envexpbot.2013.12.016.
- RAHANTANIAINA, M., TUZET, A., MHAMDI, A. et NOCTOR, G., 2013. Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Frontiers in Plant Science*. 2013. Vol. 4. DOI 10.3389/fpls.2013.00477.
- RANIERI, A., CASTAGNA, A., PADU, E., MOLDAU, H., RAHI, M. et SOLDATINI, G. F., 1999. The Decay of O₃ through Direct Reaction with Cell Wall Ascorbate is not Sufficient to Explain the Different Degrees of O₃-sensitivity in two Poplar Clones. *Journal of Plant Physiology*. février 1999. Vol. 154, n° 2, p. 250-255. DOI 10.1016/S0176-1617(99)80216-8.
- REGIER, N., STREB, S., COCOZZA, C., SCHAUB, M., CHERUBINI, P., ZEEMAN, S. et FREY, B., 2009. Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. *Plant, Cell & Environment*. décembre 2009. Vol. 32, n° 12, p. 1724-1736. DOI 10.1111/j.1365-3040.2009.02030.x.
- TANG, Z. et YANG, H., 2013. Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Molecular biology reports*. 2013. Vol. 40, n° 8, p. 5105–5114.
- TAUSZ, M., GRULKE, N. et WIESER, G., 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution*. juin 2007. Vol. 147, n° 3, p. 525-531. DOI 10.1016/j.envpol.2006.08.042.
- WANG, S., LIANG, D., LI, C., HAO, Y., MA, F. et SHU, H., 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012. Vol. 51, p. 81–89.
- WITTIG, V., AINSWORTH, E., NAIDU, S., KARNOSKY, D. et LONG, S., 2009. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology*. février 2009. Vol. 15, n° 2, p. 396-424. DOI 10.1111/j.1365-2486.2008.01774.x.
- YANG, F., XU, X., XIAO, X. et LI, C., 2009. Responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Biologia Plantarum*. 2009. Vol. 53, n° 3, p. 511–516.
- YOSHIDA, S., TAMAOKI, M., SHIKANO, T., NAKAJIMA, N., OGAWA, D., IOKI, M., AONO, M., KIBO, A., KAMADA, H., INOUE, Y., SAKI, H., 2006. Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 47(2): 304-308.

Annexes

Annexe 1 : Schéma du dispositif expérimental.



4 traitements (16 arbres chacun):

- Témoin
 - Ozone
- } 50 % d'humidité

- Sec
 - Ozone sec
- } 30 % à 25 % puis 20 % à 15% d'humidité

Annexe 2 : Séquences des gènes Glutathion Réductase et Déhydroascorbate réductase. L'alignement des séquences a été obtenu grâce au logiciel Clustal W2. L'emplacement des amorces spécifiques à chaque gène est indiqué.

GR 2/5

Potri.001G050000.1
532
Potri.003G178200.1
586
Potri.015G037800.1
599

Potri.001G050000.1
592
Potri.003G178200.1
646
Potri.015G037800.1
659

Potri.001G050000.1
652
Potri.003G178200.1
706
Potri.015G037800.1
710

Potri.001G050000.1
712
Potri.003G178200.1
766
Potri.015G037800.1
764

Potri.001G050000.1
772
Potri.003G178200.1
826
Potri.015G037800.1
824

Potri.001G050000.1
832
Potri.003G178200.1
886
Potri.015G037800.1
884

Potri.001G050000.1
892
Potri.003G178200.1
946
Potri.015G037800.1
944

Potri.001G050000.1
952
Potri.003G178200.1
1006
Potri.015G037800.1
1004

Potri.001G050000.1
1012
Potri.003G178200.1
1066
Potri.015G037800.1
1062

```
* ***** . * :***** . * **:*:* : .***:***** ** . .***.**
ACGGTTGGGAAGTGAACGAGAAAGTGGACTTTAACTGGAAAAAACTGTTGCAGAAAAAGA
ATGGTTGGGAAATCAATGAAAAGTGGACTTCAACTGGAAAAAACTGTTGCAGAAAAAGT
TTGGATGGAAGTATGACAGCGAACCACTTCATGATTGGAATACTTTGATGGCTCACAAAA
: **:*:* . : . * .. . * . : : . * *****: : **:* . .***.
CGGATGAAATAATCAGGTTAAATGGAATTTACAAGAGGTTACTATCTAATGCTGGGGTTA
CAGATGAAATAGTCAGGCTAAATGGAATTTACAAGAGGTTACTATCTAATGCTGGGGTTA
ATGCCGAGTTGCAGCGCCTGACCGGTATTTATAAGCACATTCTCAATAACGCTGGTGTCA
. * . **:* . : . * * . * . **:****** ** . .***.*** ***** ** *
AACTGTATGAAGGAGAGGGAAAGATTGTTGGTCTTAATGAAGTTGAGATGACTCAACTAG
AACTGTATGAAGGAGAGGGAAAGGTTGCCGGTCTTAATGAAGTTGAACTGACACAAGTAC
CTTTAATTGAAGGCCGCGGAAGATTGTCGATCCGCACACAGTTGATGT-----TG
.: .***:***** . **.*.*** * .*** * .***** *
ATGGGACTAAATTGAGGTACTCAGCAAAGCACATACTGATTGCAACTGGCAGTAGGGCTC
ATGGCACTAAATTGAAATACTCAGCAAAGCACATCCTGATTGCAACTGGCAGTAAGGCTC
ATGG-----AAAGCTCTATTCTGCACGGCACATACTTATTCTGTTGGAGGACGCCCGT
**** * : . * . **:****** ** .*** . * .***.***
AACGACCAGCTATTCCTGGGCAGGAGCTGGCCATAACTTCTGACGAGGCATTGAGTTGG
AGCGTCCCAATATTCCTGGGCAGGAGTTGGCCATAACTTCTGATGAGGCATTGAGTTGG
TCATTCCTGACATTCTGGGAGTGAATACGGGATGATTCTGATGCTGCACCTTGATTTGC
: . : ** .. ***** . ** . * .***.***** . *** * .***
AAGATTGCCTAAGCGTGCAGTGGTGTGTTGGTGGGGGTACGTTGCTGTTGAGTTTGCTT
AAGATTGCCAAGCGTGCAGTAGTGTGTTGGTGGAGGTACATTGCTGTTGAGTTTGCTT
CATCTAAGCCGGAGTAAATCGCCATAGTTGGTGGAGGTATATTGCGTTAGAATTTGCTG
. * .***:*** .***.*** . * .*****.***** .*** * :***.*****
CAATATGGCGTGGCATGGGTGCTACTGTGGATCTATTTTCAGAAAGGAACTTCCATTAA
CGATATGGCGTGGCATGGGTGCTACTGTGGATCTATTTTCAGAAAGGAACTTCCGTTAA
GAATTTCAATGGCTTGAAGAGCGATGTTCAATGATTTATAAGGCAGAAAAAAGTATTAA
.***: .*****:*** . .**** ** ***** * .***.***.***: .****
GGGGTTTTGATGATGAAATGAGGGCCGTGGTTGCGAGAAATCTAGAAGGCAGGGGAATTA
GGGGTTTTGATGATGAAATGAGGGCTGTGGTTGCAAGAAATCTTGAAGGCAGGGGAATTA
GGGGATTTGATGAAGAGATCAGAGATTTTGTGTCAGAGCAGATGTCTCTAAGAGGAATCG
****:*****:*** **.*. * *****.*** * . : .***.*****
ATTGTCATCCAAGATCAAATTTGATAGAGTTGACTAAAACAGAGGAGGGAATAAAAATTT
ATTGTCACCCAGAACAAATTTGACAGAGTTGACTAAAACAGAGGATGGAATTAAGTTC
AGTTCATACAGAGGAGTCACCTCAGGCTATTATTAAGTCAGCTGATG--GTTCAATTGTC
```

GR2 up

GRB up

GRA up

GRB down

GRA down

GR2 down

```

Potri.001G050000.1 1067 ACACCGATCACAAAGAGGAGCTGCTGGCAGATG-----TTGTACTTTTGGCCACTGGTAG
Potri.003G178200.1 1121 GCACAGATCATGGAGAGGAGCTGTTGGCAGATG-----TTGTACTTTTGGCACC GGTCG
Potri.015G037800.1 1122 ACTGAAGACCAACAAAGGAACAGTCGAAGGCTTCTCACATGTCATGTTGGCCACTGGACG
.*: ...:*. . *.*****.* *...*. * :***..* ***** **:*
Potri.001G050000.1 1127 AGCTCCCAATACGAAGAGATTAATTTGGAAGCTGTAGGCGTTGAGCTTGATAATGCGGG
Potri.003G178200.1 1181 AGCTCCCAATACGAAGAGATTAATTTGGAAGCTGCAGGCGTTGAGCTTGATAAAACAGG
Potri.015G037800.1 1182 TCGGCCTAATACAAAGAACTTGGGACTGGAGAGTTTGGGGGTAAAAATGACCAACAATGG
: ** *****.*****.***.***: ***** * ** **.*.*** .. ** .. **
Potri.001G050000.1 1187 AGCTGTGAAGGTTGACGAATACTCTCGCACCAACATACTACCATATGGGCTGTTGGTGA
Potri.003G178200.1 1241 AGCTGTGAAGGTTGACGAGTTCTCTCGCACCAACATACTAGCATATGGGCTGCTGGTGA
Potri.015G037800.1 1242 AGCAATAGAGGTTGATGAATACTCGTGCACCTCAGTTCCTTCCATTTGGGCAGTGGGAGA
***:.*.***** **.*:*** *****:..*:***: ***:*****:* **:*
Potri.001G050000.1 1247 TGTCACAAACCGAATGAATCTGACTCCTGTGGCCTTAATGGAGGGAACATGCTTTGCAA
Potri.003G178200.1 1301 TGTCACAAACCGAATGAATCTTACTCCCGTGGCCTTGATGGAGGGTTCATGCTTTGCTAA
Potri.015G037800.1 1302 TGTTACAGATAGGATAAATTTGACTCCTGTGCTTTGATGGAGGTTGGGCATTGGCAAA
*** **.* *.**.*.*** * ***** ** ** **.*.*****.* . ** **:*
Potri.001G050000.1 1307 AACTGTTTTTGGCGGGCAACCTACCAAACAGACTACAATCACATACCATGTGCTGTATT
Potri.003G178200.1 1361 AACTGTTTTCGCAGGGCAACCTACCAAACAGACTACAATCACATACCATATGCTGTGTT
Potri.015G037800.1 1362 AACTCTCTTTCAGAATGAGCCAAACAAACCTGATTATAGAGCTGTTCCATCTGCTGTGTT
**** * ** ..... *.*:***.*****:* ** *.: . *:* **** *****.**
Potri.001G050000.1 1367 TAGCATACCTCCTCTCTCTGTGGTGGGCCTCAGTGAGGAGCAGGCGTTAGAGCAAGCAA
Potri.003G178200.1 1421 TAGCATTCCTCCTCTCTCTGTAGTGGGCCTCAGCGAGGAGCAGGCATTAGACCAAGCAA
Potri.015G037800.1 1419 TTCTCAGCCTCCAATGGACAAGTTGGTCTTACGGAAGAACAGGCTACA---AAAGASTA
*: .: *****:.* :.:** ** ** * **.*.***** : * **.*.***
Potri.001G050000.1 1427 TGGTGATGTATTGGTTTTTCACFTTCGACTTCAACCCTATGAAGAATACTATCTCTGGACG
Potri.003G178200.1 1481 TGGTGATGTGTTGGTTTTTCACFTTCTACCTTTAATCCTATGAAGAACACGATCTCTGGTCG
Potri.015G037800.1 1479 CGGTGATATTGATGCTTTCACAGCAAATTCAGGCCTTTGAAGGCTACTCTCTCAGGGCT
*****.* : ** *****: * * * * * **.*.*****. ** **.*.***
Potri.001G050000.1 1487 ACAAGAGAAGACGGTAATGAAGCTTGTGTTGATGCTGAGACGGATAAAGTTCTTGGAGC
Potri.003G178200.1 1541 ACAAGAGAAGACAGTAATGAAGCTTGTGTTGATGCTGAGACGGATAAAGTTCTTGGAGC
Potri.015G037800.1 1539 TCCAGATCGGGTCTTCATGAAACTAATAGTCTGTGCTAAGACAAACAAAGTTCTTGGGTT
:*.* ** ..* .*.*****.***:.* ** **.*.*****. ** **.*.*****.
Potri.001G050000.1 1547 TTCCATGTCTGGGCCAGATGCACCTGAAATCATGCAGGGTATTGCTGTTGCGCTGAAGTG
Potri.003G178200.1 1601 TTCCATGTGTGGGCCAGATGCACCTGAAATTTATGCAGGGTATTGCTGTTGCATTGAAGTG
Potri.015G037800.1 1599 GAACATGTGTGGAGAAGATTCACCTGAAATCGTGCAGGGATTGTCAGTTGCAATCAAAGC
:.*.***** **.* **.*.*****.*****:*****.*****. * **.*

```

GR (4/5)

```

Potri.001G050000.1 1607 TGGAGCAACAAAGCAACAATTTGACAGTACTGTGGGAATACACCCTTCTGCTGCTGAGGA
Potri.003G178200.1 1661 TGGAGCAACCAAGCAACAATTTGACAGTACTGTGGGAATACACCCTTCTGCTGCTGAGGA
Potri.015G037800.1 1659 TGGCTTGACCAAGGCAGACTTTGATTCCACAGTGGGTATTCACCCAACAGCAGCTGAGGA
***. .**.* ** . * .***** : **:*:**:*:**:*:**:*:**:*:**:*:**:*

Potri.001G050000.1 1622 ATTTGTGACCATGCG-----
Potri.003G178200.1 1676 ATTTGTGACCATGCG-----
Potri.015G037800.1 1719 ATTTGTTACATGAGGACTCCTACTAGAAAGATTTCGAGAGCGTCCCTCCAGCTGAGGGGAA
***** **:*:**.*

Potri.001G050000.1 1639 -----TTCAGTGACTAGACGCG-----
Potri.003G178200.1 1693 -----TTCAGTGGCAAGGCGTG-----
Potri.015G037800.1 1779 GGCAGATCAGGATGTTAAAGCAGCAGCAGGGGTTTAGCGTGGGTTTACTTTGTGCATGATA
          : *** * . : : . ** *

Potri.001G050000.1 1674 -----TTACTGCTGGTGGCAAACCAAAGA-----CAACAAATCCG-----
Potri.003G178200.1 1725 -----TTACTGCAAGTGGCAAACCGAAG-----ACAAATCTG-----
Potri.015G037800.1 1839 ACCCTTTCAAGCATTACTGAATATCTCAACCAACTGGGCAGGCAGTCACTCCGGAAAATA
          *****: . * ***.*...: * . . * . ** *

Potri.001G050000.1 1702 ---TAAAAACATCAGCAGAAAAAGAA-----AATC
Potri.003G178200.1 1752 ---TAAAAAT-ATCAGTTCAAAAAGAA-----AATC
Potri.015G037800.1 1899 GCTGGCAAATATCTGCTTTGATAGTAGCCAAGGAATGTTCCGATGTTGATATCTGATTA
          ..***: ***:* : : : * .*** *          * : .

Potri.001G050000.1 1762 CAAAAATGATATATTGCTTGAATTCAGCTTTCTCGTGGTCATCGGAACTTTTCATGTTAG
Potri.003G178200.1 1762 ACAGGAAAAT-----
Potri.015G037800.1 1959 CAGACATCATTGGAAGCGTAAATGGTGGGAAGTTCATGTTGGGGTCATTGGTGAACATAAG
          .... * : **

Potri.001G050000.1 1812 CARGTSCAAGAAATAGATGCAATTAGGGCGTGGCTACGAC-----TTTTCAACCC
Potri.003G178200.1 1777 -----CATTGAG-----TTATCACC
Potri.015G037800.1 2019 CAAACGAATAAAAAGCTTTCAAAGGAATAATAATCACAAGGCAGTGTAGTTTTTGCTCT
          **:: . *          ** . *

Potri.001G050000.1 1868 AATAAAAGTTCGCTCGCGTCATGATATAGTATTGTATGCCTGGCAG----TTCAGATGCG
Potri.003G178200.1 1829 AATAAAAGTTC----ATGTCATTATAGGATTTTGAAAGCCTGGTAG----CTCTGTTTCT
Potri.015G037800.1 2079 TACAAATGTGGAAATGAGTGGGGAATTGCAATAATATAACATGTTAGGAATATCTGTTTCC
          : * ***: ** . ** . * : : . : : * : : * . ** **          * : * : *

Potri.001G050000.1 1894 TC-----TATGGAAACTATGTTTCTTTTTT
Potri.003G178200.1 1847 AT-----TACAGAAAAG-----TAATTT
Potri.015G037800.1 2139 CTGTTTATGTTTTTTTTCCCTTTCGTTTTGTTGTATACTGAAACAGTATTTGTTTATTT
          ** *****          * : : ***

```

```

Potri.001G050000.1 1952 --TTTACCTAAGTAATTAGATGTTACCTTTTCAGTGGTGGACGAATACCATCTTAGAACCA
Potri.003G178200.1 1897 --AATGCCAAAGTAATAT-ATGTCCTATTTTGGAT-TGGCACCATACCCTT-----CCT
Potri.015G037800.1 2197 GAGATAATTTAAGGATGATAAATTCATCTCGCCCGCTCTCTCTCACTCTCG--TACC
      :*. . :*. .** : :*. :.* * . * . .**.* *
      :
ATGTGGACTATTTGACTTTTTTATCTCTTATTAAATATGGCATGCGCCTTTTTATGGTTT
Potri.001G050000.1 2012 TTATGGTGGATACGAACT-ACTATCTCA-----GAACCAGTGTGTTG---A
Potri.003G178200.1 1938 TTGTGGGGGAAACGAAAGTAGAAAGTACTAACATGG-----GAGCAGATCAATGGGAT
Potri.015G037800.1 2250 :*.*** * : ** . : : * : * . * . .**.* * : : ** :
      :
TGTGAAA-----GTTATTGTGCATTGTTAATGTTTCATG-----AAGG
Potri.001G050000.1 2052 GGAGGTAG-----GTCGTT-----TTATTTACATTTACGTT-----GTTG
Potri.003G178200.1 1973 TGCAGCCAGACAAAGCTGAACTTGCTAATCAATTACACCAACGAAGGCCAAAACAGGAGG
Potri.015G037800.1 2310 * . . . * : ** * . :***. : : : * : : *
      :
TAGGCTGTAACAGCTGCTTGCATAAAGAATTTGTTGATG-----TCGATTATGG----A
Potri.001G050000.1 2102 TG-----AAAAGCT-----CTGCTG-----CTGTTTATTG----A
Potri.003G178200.1 1999 GATATCGAGTAAGCACAGTGATTAACCTAATAAATGCTTGGCTGGCTGATTCTTCAACCA
Potri.015G037800.1 2370 . . . .*** : ** * * :***.* *
      :
TGTTGTATCCTGGATCTATAATACAAGG---CTCTTGCTGCATGTAAGATT----AAG
Potri.001G050000.1 2153 GGAAGTCCCCTGTTTGTAAAATGGTGG---CCCGGTAGTTTGCCCGGAT----CAG
Potri.003G178200.1 2050 AATTGTGGCCTCAAACCTGAAACATAAGTTGCATCTTACTGATTAATGGATGGAAAAAG
Potri.015G037800.1 2430 . : ** *** : : * : ** : : * . * . : * : * . : * * . **
      :
ACCTGCTTGTAT-----ACAGATATATCAAAAAGTATCCGCTGTACCTAAATTGTTG
Potri.001G050000.1 2206 TTGTCCAAG-----CAACTATTGCATG-----CCTTGATT----
Potri.003G178200.1 2080 TTATCGAAATAATCTTTGGGCTGTTATATCGATCTCGTGCATGGAGGAGCTAAGTAATT-
Potri.015G037800.1 2489 : * : : . * : : *** : * : : * : : * : : * : : * : : * :
      :
TTTTTCCTG-----CACACACATCACATATTGTATACCCTTGCCTTCACAGTAAG
Potri.001G050000.1 2257 --CATCCGG-----GAAAAAAAAAAAAAAGAGTG----ATTTACTTCGATGCCTT
Potri.003G178200.1 2124 ATCATCGGGACACTGTTTGCCAAAGATAACGCAAACCTGTTTAGGTAGCGTTTGGAGAAAT
Potri.015G037800.1 2549 : ** * . . . * * : . . * : * . * . ** . : * : :
      :
G-----ACAATTG-----
Potri.001G050000.1 2266 G-----AC-----
Potri.003G178200.1 2127 GGAGATAATAAGTAAAAACAACATGTTTGGATGAAGTAGAGAATTAGAGAAGTGAAAA
Potri.015G037800.1 2609 * **
      :
-----CTCCT 2271
Potri.001G050000.1 -----
Potri.003G178200.1 -----
Potri.015G037800.1 TAAATCTCTT 2619

```

PLEASE NOTE: Showing colors on large alignments is slow.

DHAR (3/4)

```

      **..** *
      :* :.*** ** * :* *.:
Potri.008G049300.1 AG-----AAGAAG-----T
945
Potri.010G211600.1 GGGCAAG-----AAAGAAAGAAAGTTAAAGAA
843
Potri.017G125100.1 TGGCCTTGAAACTAAATATAATTTTCTTTTCAGTTAACAGATGCAATTCTGTCAACCACAT
1140
      *
      .*:*.
      :
Potri.008G049300.1 GCTGAG-----CCTG-----GTGTATGTTAG----AAATCTAA
974
Potri.010G211600.1 GTTGAG-----CCTG-----GTGTATGTCAG----ACATTTTA
872
Potri.017G125100.1 TGTGGGGACGAGAAAAATCCTTCTATGTATATTTTCATGAGTATGTCAGTGTGATGGTATA
1200
      **.*
      ***.
      *:***** ** * . :.*
Potri.008G049300.1 AACTATAAGCAGG-----
987
Potri.010G211600.1 AAA-CCAAGCTPGTTGCT-----
889
Potri.017G125100.1 AATGCCTTGCTAAATGCTTCATGTGCATACTTACACTTCCCAGTGTTCCAAGTTGCACTC
1260
      ** . :***:..
Potri.008G049300.1 ----GGGTGCTCTATTATCTAATAAAAATCCA----TTAACCTG-----
1022
Potri.010G211600.1 ----GTGTGTTCTATCATCTAATAAAAATCTA----TTAACCTA-----
924
Potri.017G125100.1 TTTTTTATGATTTGTTGTCTTGGTAAGTATAGTTCTTTGCCTAGTGCTCATATGAAAGAA
1320
      .** * *. * .***: . :**.* * **:.***.
Potri.008G049300.1 ----TCAGTGCAGTGGC-----CTATTAATTTGAAATGGCTGG-----
1056
Potri.010G211600.1 ----TCAATG-----TGAATGGCTGG-----
942
Potri.017G125100.1 TGTTACACAGAAGTACTGAACTACCAAGCACTTCCGCTTAACTGCCTTGGTACTCTAGTG
1380
      :** :*
      * ** .*** **
Potri.008G049300.1 -----CATTATTTAATCTAGC-----TCTGTTA
1080
Potri.010G211600.1 -----CATTGTATTTTCTAGCAACG-----CGTTTCTGTTG
974
Potri.017G125100.1 TCAACCCTATACGCCCACTGCCATATACATTCTAGAGGCAGACAGAGCTCTTACAAAAT
1440
      *.:*.: : : :****.
      :*.: : :
Potri.008G049300.1 TATTG---TTATTGGAGCACTGG--CTGATGTCCAT-----TCTGTTACTTTGCTC
1126
Potri.010G211600.1 TTTTG---TTATGAGAGCACTGG--CTAATGTCCAT-----TCTGTTAGTTTGTCTC
1020
Potri.017G125100.1 CTTTGAATTTCTGAGGGCACAGGGCCTTTTCTTCTTGGAGGTGATCAACTTCTTTATGC
1500
      :*** **.* *.***:*** ** :* * :.* **.: * :***. *
Potri.008G049300.1 CG-----TTGTTT-----A
1136
Potri.010G211600.1 CGTTTTGTGTTGTTTGTGTTTTATTTTCGTTTTTAATGTGAGGACGTTCTGCAACTTCA
1080
Potri.017G125100.1 CAAGGAAGATGGAAGCCTCTTCATCCATCGATCTCTTGAAGAACCATGGATATGTGTATC
1560
      *.
      * *.:
Potri.008G049300.1 TGATA--CATCCATTAATAATTCGAG-----
1160
Potri.010G211600.1 TGATAGGTATACATTGATAACAAATGGGCTG-----
1111
Potri.017G125100.1 AAGCTTTCCTCCATGAATTCACATGTCCAAGGGCACAAAAGCAAACATGACATCTACTG
1620
```

DHAR (4/4)

```

... 1 .*.*** .**1.1...1*
-----
Potri.008G049300.1 -----
Potri.010G211600.1 -----TCCTTGAAATGTTATTAGGAGTTTGGGAGGTGTGCCCAAATGCTTTTTT
1160
Potri.017G125100.1 TGACATGGTTGTCCATGTTTCATCAAACAAGGATTTACTTACAGAACTTAAAGTATTAA
1680

Potri.008G049300.1 -----
Potri.010G211600.1 CAAACTCAGCTAGGAAGCCAGAGATTGGGTTTTACCAAACGGAAACGTTGATTGTGCAA
1220
Potri.017G125100.1 TAGATTCTACATCGAATCCCATGCCAGAATACATGAATGCTGATGCTTAGAATTATGGAT
1740

Potri.008G049300.1 -----TT
1162
Potri.010G211600.1 TGCCATTGGCAGGCATGCATTTAAATGCT--AGATACAGGCCTTGACCAGCTCTGTTAAT
1278
Potri.017G125100.1 AGCGTAGCACACGATAACTTTTAACTTCTCTTTTCCCATCTCTTCTTGTGCTAATATT
1800
:

Potri.008G049300.1 GAAGCTGGACTGCATTAT-----CCCTCCGAGATTTCCATTTGC-----
1202
Potri.010G211600.1 GAAGTTGGACTGCGTTAC-----CCCACTGAGATTTCCATTTGATGGAAATGGCA--
1329
Potri.017G125100.1 TCTAGTATAATGAATAAATGTTCTACTATCTTAGTTAAAGCTCTTGATGTTTGATACCGT
1860
.:. *. *.**..*:* * .:* **:*::: *: **.,

Potri.008G049300.1 -----
Potri.010G211600.1 -----
Potri.017G125100.1 GTTCTCCTCTTTTCTCTT 1879

```

PLEASE NOTE: Showing colors on large alignments is slow.

Résumé :

Actuellement, les végétaux sont de plus en plus confrontés à des contraintes environnementales importantes dues aux changements climatiques et aux pollutions atmosphériques. Cela augmente les conditions de stress oxydants. Afin de déterminer l'implication du métabolisme du glutathion, impliqué dans la régénération de l'ascorbate, le principal anti-oxydant de la cellule végétale, deux génotypes de *Populus nigra x deltoides* (Carpaccio et Robusta) ont été exposés pendant 17 jours à différents traitements : une sécheresse modérée, une fumigation d'ozone à 120 ppb ou une combinaison des deux traitements. Pour explorer les effets des stress et l'interaction entre les deux stress (ozone et sécheresse), nous avons caractérisé différents paramètres écophysiologicals, biochimiques et moléculaires. Il ressort de nos résultats que Carpaccio et Robusta sont tous deux tolérants à une sécheresse modérée, Robusta présentant notamment une efficacité d'utilisation de l'eau élevée. Les deux génotypes présentent des différences de sensibilité à l'ozone. Robusta est, quant à lui, plus impacté au niveau de ses feuilles (nécroses plus importantes). Cette différence de sensibilité pourrait provenir d'une moins bonne capacité de Robusta pour rétablir l'homéostasie cellulaire après un stress oxydant. Pourtant, il ressort de l'analyse de l'expression de gènes et des activités enzymatique de la glutathion réductase et de la déhydroascorbate réductase que Robusta a une réponse plus précoce au stress oxydant. Le seuil de phytotoxicité à l'ozone de Robusta peut donc être atteint avant celui de Carpaccio.

Abstract :

Nowadays, plants are facing stronger environmental stresses because of climate change and atmospheric pollution. That leads to an increase of oxidative stress for trees. We particularly focus on the metabolism of glutathione because of his importance to regenerate ascorbate (the most important antioxidant for plants). To do that, we expose two genotypes of *Populus nigra x deltoides* (Carpaccio and Robusta) to various treatments during 17 days: a moderate drought, an ozone fumigation of 120 ppb or both treatments at the same time. To improve our understanding of the effect these stresses have, we measured some ecophysiological, biochemical and molecular parameters. Our results show a mild drought tolerance for both genotypes, with a high water use efficiency for Robusta. Furthermore, both genotypes show a different sensitivity to ozone stress. Indeed, Robusta shows more foliar damage. This difference of sensitivity could be the result of a lesser quality of detoxification and a loss of cell homeostasis. Nevertheless for Robusta, gene expression and enzymatic activities of glutathione reductase and dehydroascorbate reductase shows an early stage of reaction to oxidative stress. Thus, under ozone treatment, the phytotoxic threshold of Robusta may be reached before the one of Carpaccio.