Variabilité génétique de la réponse du métabolisme carboné du chêne pédonculé (Quercus robur L.) à des teneurs croissantes en CO2

Xavière Torti-Marcy

▶ **To cite this version:**

Xavière Torti-Marcy. Variabilité génétique de la réponse du métabolisme carboné du chêne pédonculé (Quercus robur L.) à des teneurs croissantes en CO2. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN10130 . tel-01754326

HAL Id: tel-01754326
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754326

Submitted on 30 Mar 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-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

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

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHEQUE

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

Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
Spécialité : Biologie Végétale & Forestière

présentée par

Xavière TORTI – MARCY

Variabilité génétique de la réponse du métabolisme carboné du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) à des teneurs croissantes en CO_2

Soutenue publiquement le 14 novembre 2005 à Nancy devant la commission d'examen :

J.-L.PRIOUL	Pr. , Université Paris-Sud	Rapporteur / Président du jury
C.DAMESIN	Pr. , Université Paris-Sud	Rapporteur
A.KREMER	DR, INRA Pierroton	Examinateur
J.-M. GUEHL	DR, INRA Nancy	Examinateur / Codirecteur de thèse
P.DIZENGREMEL	Pr , Université Nancy I	Examinateur / Directeur de thèse

Unité Mixte de Recherche 1137 INRA / UHP Ecologie & Ecophysiologie Forestières

Laboratoire d'Ecophysiologie Cellulaire & Moléculaire
Faculté des Sciences et Techniques ; BP 239
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

INRA - Centre de Nancy
54280 Champenoux

Remerciements

Merci tout d'abord à Pierre Dizengremel et Jean-Marc Guehl de m'avoir offert l'opportunité de cette thèse, et de m'avoir soutenue quand sa réalisation devenait problématique... et merci aux membres de mon jury de thèse de m'avoir offert l'opportunité de la terminer.

Un immense merci à Didier Le Thiec pour m'avoir considérablement aidé dans l'expérience en serres et dans tous les travaux d'écriture, ainsi que pour sa gentillesse et sa grande disponibilité.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à Oliver Brendel pour avoir pris du temps pour m'expliquer le principe des QTLs et celui du logiciel d'analyse, et encore plus pour l'interprétation des résultats (!). Je le remercie également, ainsi que son épouse Caroline, pour m'avoir hébergée et pour les longues discussions sur les bons petits plats végétariens, la Bavière, la médecine par les plantes, la fantasy et l'art d'élever les bébés. J'espère que notre amitié s'étendra bien au-delà de la fin de thèse...

Un très grand merci à Erwin Dreyer et Mark Adams pour m'avoir aiguillée sur l'extraction de la Rubisco, ainsi qu'à Charles Warren pour m'avoir fourni le protocole et pour son aide dans la résolution des nombreux problèmes que nous avons pu rencontrer. Merci au professeur Alain Nicolas pour m'avoir reçu dans son laboratoire de la faculté de Pharmacie de Nancy et merci, merci et encore merci à Igor Clarot pour avoir effectué ces analyses, malgré tous les plantages en règle de l'électrophorèse capillaire devant un élément inconnu à son répertoire traditionnel, pour sa gentillesse et pour sa patience infinie dans l'attente d'une hypothétique publication (si, si elle sera écrite dès que j'aurai soutenu).

Merci à Claude Bréchet à l'INRA de Nancy pour sa gentillesse et toutes les analyses de discrimination dont il ne semble pas voir la fin. Merci également à Nathalie Ningre ainsi que François Willm qui ont accompagné Didier dans toutes les mesures d'échanges gazeux, Olivier Bourriaud, Anne Caniard et Marc Oury pour leur aide dans l'extraction de la cellulose.

Merci à tous les permanents du laboratoire de Biologie Forestière de la faculté des sciences de Nancy (Dominique Gérant-Sauvage, Marie-Paule Hazenfratz-Sauder, Yves Jolivet, Joëlle Gérard, Elisabeth Weber, Dany Afif, Mireille Cabané, Jean-Claude Pireaux et Jacques Banvoy) pour leur aide technique et surtout pour leur très grande gentillesse. Les longues discussions de la salle café me manquent déjà... et eux encore plus ! Un merci tout spécial à Marie-Paule -ainsi qu'à sa famille- qui m'a épaulée dans un moment critique de ma thèse et de ma vie, ce dont je ne lui serai jamais assez reconnaissante.

Merci beaucoup aux secrétaires –mamans bis- des deux unités de l'UMR, Lysiane Laviron à l'université et Rosine Gross à l'INRA, pour m'avoir beaucoup facilité les déplacements et autres tracasseries administratives et pour leurs attentions à mon égard.

Merci enfin à tous les stagiaires, thésards, ATER et petits chanceux déjà diplômés pour tous les petits ou grands moments que nous avons pu passer ensemble, et qui ont fait que la thèse n'a pas été qu'une longue épreuve pas toujours facile. Merci donc à Christine, Damien, Blanca, Séraphine, Fabienne, Jérôme, Helio, Anne Jambois (mention spéciale pour le Corton-Charlemagne !), Julien (s), Sylvain, Matthieu, Luis, Emilien, Tétê, Aurélien, Karine, Virginie Acheré et Marie-Noëlle pour leur incroyable bonne humeur et leurs conseils avisés, et merci à tous ceux que j'aurai certainement oubliés dans la liste, mais dont toute mon amitié leur est bien évidemment acquise.

Merci aussi à ceux des labos « du-dessus » et « du-dessous », en particulier Annick, Valérie, et Claudine, toujours disponibles pour un conseil ou simplement pour leur gentillesse.

Merci à tous mes amis qui m'ont suivie tout au long (et ce n'est pas peu dire) de la thèse, et qui vont très certainement être surpris et soulagés que je leur dise « ça y est ! j'ai fini ! ». Merci donc à tous, Anne-Laure et Dimitri qui m'ont très souvent hébergée, Marie et François, Virginie, Isabelle, la compagnie des anciennes de prépa et toute la troupe grandissante des Ifmaliens et des avioneux de Meudon. Merci aussi aux petits bouts de choux (Eglantine, Mélissa, Sophie, Louna et Hadrien) qui sont venus en cours de route et qui ont émaillé mes séjours chez leurs parents de souvenirs colorés (et très souvent sonores !) que j'associerai désormais toujours à la rédaction de ce manuscrit.

Merci à ma famille pour avoir été présente tout au long de ce chemin, et en particulier à mes parents pour m'avoir épaulée avec tout leur amour dans tous les moments de la thèse, les bons comme les moins bons, et pour y avoir cru jusqu'au bout.

Merci enfin à Gautier, l'homme de ma vie, pour avoir été toujours là à mes côtés, pour son réconfort -même maladroit-, pour sa patience et ses râleries qui font relativiser les choses, et pour avoir fait l'effort incroyable de me préparer des petits plats quand je n'en avais pas le temps, ainsi que pour ses « cœurs fondants-coulants » au chocolat qui ont toujours été un remède souverain contre le trop-plein de stress. Et un merci câlin à Samhaine, pour les longues nuits qu'elle a passées à côté de moi lorsque je rédigeais, et pour ses ronronnements si apaisants ...

Rien que pour cela, Champagne ! ! !...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 1

INTRODUCTION 3

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I. LE CO_2 ATMOSPHERIQUE ET L'ECOSYSTEME FORESTIER 5

I.1. EVOLUTION DE LA TENEUR EN CO_2 DANS L'ATMOSPHERE 5

I.2. LES FLUX DE CARBONE DANS L'ECOSYSTEME TERRESTRE ET FORESTIER 6

II. LE CHÊNE PEDONCULE (*QUERCUS ROBUR* L.) 7

III. EFFET DU CO_2 ELEVE SUR LES ARBRES 8

III.1. MODIFICATION DE LA CROISSANCE 9

III.2. DÉVELOPPEMENT FOLIAIRE 10

III.3.TENEURS EN CARBONE ET AZOTE DANS LES FEUILLES 11

III.4. MODIFICATION DES ECHANGES GAZEUX 13

III.4.1. Conductance stomatique *13*

III.4.2. Photorespiration *14*

III.4.3. Photosynthèse *15*

III.4.4. Respiration *17*

III.5. MODIFICATION DU $\Delta^{13}C$ ET DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU (WUE) 17

III.6. LE PHÉNOMÈNE D'ACCLIMATATION AU FORT [CO_2] ATMOSPHÉRIQUE 20

III.7. MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES DU METABOLISME FOLIAIRE 24

III.7.1. Réorganisation de la collecte lumineuse *24*

III.7.2. Le métabolisme carboné primaire *25*

III.7.3. Le métabolisme azoté primaire dans les feuilles *28*

IV. REGULATION GENETIQUE DE LA PHYSIOLOGIE 30

IV.1. PRINCIPE DE LA DETECTION DE QTLS 30

IV.2. RECHERCHE DE QTLS ASSOCIES AUX PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES 31

IV.3. LES INTERACTIONS AVEC L'ENVIRONNEMENT 33

IV.4. LA SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS (SAM) 34

IV.5. DETECTION DE QTLS CHEZ LES LIGNEUX 34

PROBLEMATIQUE 38

MATERIEL & METHODES 40

I. LE MATERIEL D'ETUDE ... 40

II. MESURES & PRELEVEMENTS EN SERRES ... 41

II.1. MESURES DE CROISSANCE ET DE BIOMASSE ... 41
II.2. CHOIX DES FEUILLES ÉTUDIÉES ... 42
II.3. MESURES D'ÉCHANGES GAZEUX ... 42
II.4. ORGANISATION DES PRÉLÈVEMENTS SUR LES ARBRES ... 43
II.5. MESURES DES CARACTÉRISTIQUES FOLIAIRES ... 43

III. ETUDE DE LA COMPOSITION ISOTOPIQUE EN ^{13}C DES ARBRES ... 44

III.1. MESURE DU RAPPORT ISOTOPIQUE DE L'AIR ... 44
III.2. MESURE DU RAPPORT ISOTOPIQUE DES FEUILLES DE CHÊNE ... 45
III.3. MESURE DU RAPPORT ISOTOPIQUE DE LA CELLULOSE ... 45

IV. ANALYSES BIOCHIMIQUES ... 47

IV.1. QUANTIFICATION DE LA RUBISCO PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ... 47
IV.2. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES ... 48
IV.3. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTÉINES SOLUBLES ... 49
IV.3.1. Extraction ... *49*
IV.3.2. Filtration des extraits végétaux ... *50*
IV.3.3. Quantification des Protéines Solubles ... *50*
IV.4. ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SPÉCIFIQUES ... 51
IV.4.1. Principe des mesures ... *51*
IV.4.2. RubisCO, fonction carboxylase (EC 4.1.1.39) ... *51*
IV.4.3. PhosphoEnol Pyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) ... *52*
IV.4.4. HydroxyPyruvate Réductase (EC 1.1.1.29) ... *53*
IV.4.5. Glycolate oxydase (EC 1.1.3.1.) ... *53*
IV.4.6. Glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), dosage biosynthétique ... *54*
IV.4.7. Calcul des activités spécifiques des différentes enzymes étudiées ... *55*
IV.5. DOSAGE DU SACCHAROSE ... 55
IV.6. QUANTIFICATION DES PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES ... 56

V. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES PHYSIOLOGIQUES ... 57

VI. RECHERCHE DE QUANTITATIVE TRAIT LOCI (QTLS) ... 58

RESULTATS 61

PREAMBULE : LE CLIMAT DES SERRES ET LA RÉPÉTITIVITÉ DES RÉSULTATS ... 61

I CROISSANCE ... 62

II. ECHANGES GAZEUX **62**

II.1. ASSIMILATION NETTE CARBONÉE A_N 62
II.2. CONDUCTANCE STOMATIQUE G_S 63

III. CARACTERISTIQUES FOLIAIRES **63**

III.1. POURCENTAGE EN EAU DES FEUILLES ET SURFACE FOLIAIRE SPÉCIFIQUE 63
III.2. CONCENTRATIONS EN AZOTE ET CARBONE DANS LES FEUILLES 64

IV. TENEURS EN PROTEINES **64**

IV.1. PROTÉINES TOTALES 64
IV.2. PROTÉINES SOLUBLES 65
IV.3. INVESTISSEMENT DE L'AZOTE DANS LES PROTÉINES 65

V. REPONSES DE LA RUBISCO AU FORT [CO_2] **66**

V.1. TENEUR EN RUBISCO DANS LES FEUILLES 66
V.1.1. Quantité mesurée *66*
V.1.2. Proportion d'azote investi dans la Rubisco *66*
V.2. ACTIVITÉ DE LA RUBISCO 67
V.2.1. Activité spécifique initiale *67*
V.2.2. Activité spécifique totale *67*
V.2.3. Pourcentage d'activation *68*

VI. ACTIVITES ENZYMATIQUES AUTRES QUE LA RUBISCO **68**

VI.1. ACTIVITÉ DE LA PHOSPHO ENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 68
VI.2. ACTIVITÉ DE LA GLYCOLATE OXYDASE 68
VI.3. ACTIVITÉ DE L'HYDROXYPYRUVATE RÉDUCTASE 69
VI.4. ACTIVITÉ DE LA GLUTAMINE SYNTHÉTASE 69

VII. TENEUR EN SACCHAROSE DANS LES FEUILLES **69**

VIII. TENEURS EN PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES **70**

IX. DISCRIMINATION ISOTOPIQUE CONTRE LE ^{13}C **71**

X. EFFICIENCE D'UTILISATION EN EAU (WUE) **71**

X.1. EFFICIENCE MESURÉE À PARTIR DES VALEURS D'ÉCHANGES GAZEUX 71
X.2. EFFICIENCE MESURÉE À PARTIR DES VALEURS DE DISCRIMINATION ISOTOPIQUE 72

XI. LES QTLS DETECTES PAR CARACTERE **72**

XI.1. QTLS LIÉS À LA BIOMASSE 72
XI.2. QTLS LIÉS À LA CROISSANCE 73
XI.3. QTLS LIÉS AUX CARACTÉRISTIQUES FOLIAIRES 74
XI.3.1. QTLs liés à la surface foliaire spécifique *74*

XI.3.2. QTLs liés à l'azote foliaire *75*
XI.4. QTLS LIÉS À LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE CONTRE LE ^{13}C 76
XI.5. QTLS LIÉS À L'ASSIMILATION CARBONÉE NETTE 77
XI.6. QTLS LIÉS À LA CONDUCTANCE STOMATIQUE À LA VAPEUR D'EAU 77
XI.7. QTLS LIÉS À L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU WUE 78
XI.8. QTLS LIÉS À LA QUANTITÉ DE PROTÉINES DANS LES FEUILLES 79
XI.8.1. Protéines solubles *79*
XI.8.2. Protéines totales *79*
XI.9. QTLS LIÉS À LA QUANTITÉ ET À L'ACTIVITÉ DE LA RUBISCO DANS LES FEUILLES 80
XI.9.1. Quantité de Rubisco dans les feuilles *80*
XI.9.2. Activité de la Rubisco dans les feuilles *82*
XI.10. QTLS LIÉS AUX ACTIVITÉS ENZYMATIQUES AUTRES QUE LA RUBISCO 82
XI.11. QTLS LIÉS À LA TENEUR EN SACCHAROSE DANS LES FEUILLES 83
XI.12. QTLS LIÉS AUX TENEURS EN PIGMENTS DANS LES FEUILLES 84
XI.12.1. Teneur en caroténoïdes dans les feuilles *84*
XI.12.2. Teneur en chlorophylles dans les feuilles *85*
XI.12.3. Teneur en pigments totaux dans les feuilles *86*

DISCUSSION **87**

I. EFFET DU [CO_2] ELEVE SUR LA CROISSANCE ET LE METABOLISME 87

I.1. MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE ET DES PARAMÈTRES FOLIAIRES 87
I.2. EFFET DU FORT [CO_2] SUR LES ÉCHANGES GAZEUX 90
I.3. EFFET DU [CO_2] SUR LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE DES FEUILLES ET DE LA CELLULOSE 93
I.4. EFFET DU FORT [CO_2] SUR L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU 94
I.5. EFFET DU FORT [CO_2] SUR LE SYSTÈME PHOTOSYNTHÉTIQUE 95

II. QTLS DETECTES POUR LES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES ET LEURS REPONSES AU [CO_2] ELEVE 100

II.1. DÉTECTION DE QTLS STABLES POUR UN CARACTÈRE DONNÉ 100
II.2. DÉTECTION DE QTLS PAR ANALYSE MULTI-ENVIRONNEMENTALE (ME-QTLS) 101
II.3. COLOCALISATION DE QTLS ASSOCIÉS À DES CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES LIÉS 103

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **107**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **110**

ANNEXES **132**

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

a	Coefficient de fractionnement isotopique lié à la diffusion stomatique du CO_2
ADP	Adénosine DIPhosphate
An	Assimilation carbonée nette
A-PMSF	(4-AminodinoPhényl)- MéthaneSulfonyl-Fluoride
ATP	Adénosine TriPhosphate
B	Discrimination contre le ^{13}C exercée par les processus de carboxylation
b1	Discrimination contre le ^{13}C exercée par la PEPc
b2	Discrimination contre le ^{13}C exercée par la RubisCO
B	Fraction du carbone assimilé par carboxylation dû à la PEPc
Bicine	N,N–bis (2-hydroxyéthyl)-glycine
bp	Paires de bases
Ci, Ca	Concentration interne foliaire et concentration atmosphérique en CO_2
CIM	Composite Interval Mapping
C/N	Rapport entre les concentrations en Carbone et en Azote dans un organe
[CO2]	Concentration atmosphérique en CO_2
Carot.	Caroténoïdes
Chl.a, Chl.b	Chlorophylle a, Chlorphylle b
CP	Créatine Phosphate
CPK	Créatine PhosphoKinase
$\delta^{13}C$	Composition isotopique relative d'un échantillon par rapport au standard PDB
$\Delta^{13}C$	Discrimination isotopique d'un échantillon contre le ^{13}C
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
DTT	DiThioThréitol
ε	Coefficient d'exctinction molaire
EGTA	Acide Ethylène Glycol-bis (b-aminoéthyléther)N,N,N',N'-TétraAcétique
G6P	Glucose 6-Phsophate
Gal-3-P	Glyceraldéhyde 3-Phosphate
Gal-3-PDH	Glyceraldéhyde 3-PhosphoDesHydrogénase
GO	Glycolate Oxydase
GS	Glutamine synthétase
g_w	Conductance stomatique à la vapeur d'eau
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethaesulfonic acid)
HPR	Hydroxypyruvate réductase
λ	Longueur d'onde
LG	*Linkage group* = groupe de liaison
LOD	Logarithm Odds
MDH	Malate DesHydrogénase

ME	Multi-Environnements
ME-QTL	QTL détecté par l'analyse Multi-Ebvironnementale
Mg	milligramme
MS	Masse Sèche
n	Nombre de génotypes
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme réduite
p_{chrom}, p_{gen}	Probabilité au niveau du chromosome, du génome
p_{CIM}	Probabilité du test CIM
PEG	PolyEthylène Glycol
PEP	PhosphoEnolPyruvate
PEPc	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PEV	*Percentage of Explained Variance* = pourcentage de la variabilité phénotypique expliquée par un QTL
3-PGK	3-PhosphoGlycérate Kinase
Pi	Phosphate inorganique
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density (µmoles photons.m^{-2}.s^{-1})
PS I, II	Photosystèmes I et II
PVP	PolyVinyl Pyrrolidone
PVPP	PolyVinylPolyPyrrolidone
QTL	Quantitative Trait Locus
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase
RuBP	Ribulose bisPhosphate
SLA	*Specific Leaf Area* = surface foliaire spécifique (cm^2.g^{-1})
SPS	Saccharose Phosphate Synthase
TNC	Total Non-structural Carbon
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
WUEi	*intrinsic Water Use Efficiency* = Efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La préoccupation des hommes pour leur environnement a toujours existé, avec plus ou moins de vivacité en fonction des individus, et a suivi l'évolution des populations vis-à-vis de leur besoins matériels puis spirituels. Avec le développement des techniques, ce sont les façons de protéger l'environnement qui ont dû s'adapter face à l'apparition de nouvelles perturbations. La connaissance fine de cet environnement, dans toute sa complexité et toute sa diversité, est désormais nécessaire pour faire face aux contraintes que nos sociétés induisent artificiellement et qui s'ajoutent aux contraintes naturelles.

L'augmentation exponentielle de la concentration en CO_2 atmosphérique qui se produit depuis la seconde révolution industrielle, au milieu du XIXème siècle et qui ne cesse d'accélérer (Etheridge *et al.*, 1998 ; Barnola *et al.*, 1999) fait partie de ces nouvelles contraintes. Son rôle sur le changement climatique comme gaz à effet de serre est aujourd'hui connu, et des protocoles destinés à limiter l'émission de CO_2 d'origine anthropique commencent péniblement à se mettre en place au niveau des gouvernements, tel le protocole de Kyoto en 1997, basé sur des prévisions de variation du climat à plus ou moins long terme.

La recherche dans le domaine de la réponse des végétaux à ce facteur s'est par contre fortement développée depuis plus de 20 ans, et commence à donner des renseignements intéressants sur l'évolution des différentes zones de répartition des végétaux dans le monde compte tenu de l'évolution prévue du climat et des capacités de réponse des différentes espèces végétales. D'autres renseignements ont été également fournis sur la capacité de ces végétaux à stocker du carbone dans la biomasse, eux qui sont des producteurs primaires, transformant la matière minérale pour en faire la matière organique. L'hypothèse a été émise selon laquelle la plantation de végétaux et en particulier de forêts, sensées stocker des quantités de carbone plus importantes et plus longtemps, pourrait permettre d'éponger au moins une fraction des émissions de CO_2 avec les océans. Les protocoles internationaux se sont en partie reposés sur cette hypothèse qui a été fondée sans le recul nécessaire à des prévisions sur un long terme. C'est pourquoi la recherche dans ce domaine se poursuit dans de nombreuses directions, afin de connaître l'ensemble des paramètres qui permettront de répondre de façon assurée à ce problème, en plus d'une meilleure connaissance du fonctionnement des plantes en elle-même. La génomique fonctionnelle est une des voies les plus récentes, du fait des développements des techniques en plein essor, et de l'application aux arbres qui sont des sujets d'étude à part, avec un cycle de vie très long par rapport aux herbacées et des contraintes physiques non

négligeables (taille des individus, besoins nutritionnels…). Encore plus récente, la biologie intégrative, qui fait intervenir à la fois les connaissances en physiologie, biochimie et génomique, commence à trouver son intérêt au moment où le regroupement de la somme colossale de données dans chacune de ces disciplines en une vue intégrée du fonctionnement des végétaux devient nécessaire pour avancer dans la connaissance.

Ce travail s'inscrit dans cette mouvance, et – sans la prétention de donner une réponse assurée sur le comportement des arbres face à l'élévation du CO_2 atmosphérique – apporte des informations complémentaires sur les différentes échelles de réponse d'un arbre à cette « contrainte » environnementale et propose des pistes à suivre pour améliorer la compréhension de la physiologie des arbres et de sa réponse au changement global.

Le rapport débute par une synthèse bibliographique résumant les connaissances actuelles en matière de changement climatique et de réponse des arbres aux concentrations en CO_2 croissantes dans l'atmosphère à différentes échelles de l'individu. Les hypothèses de travail seront posées à l'issue de ce bilan.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

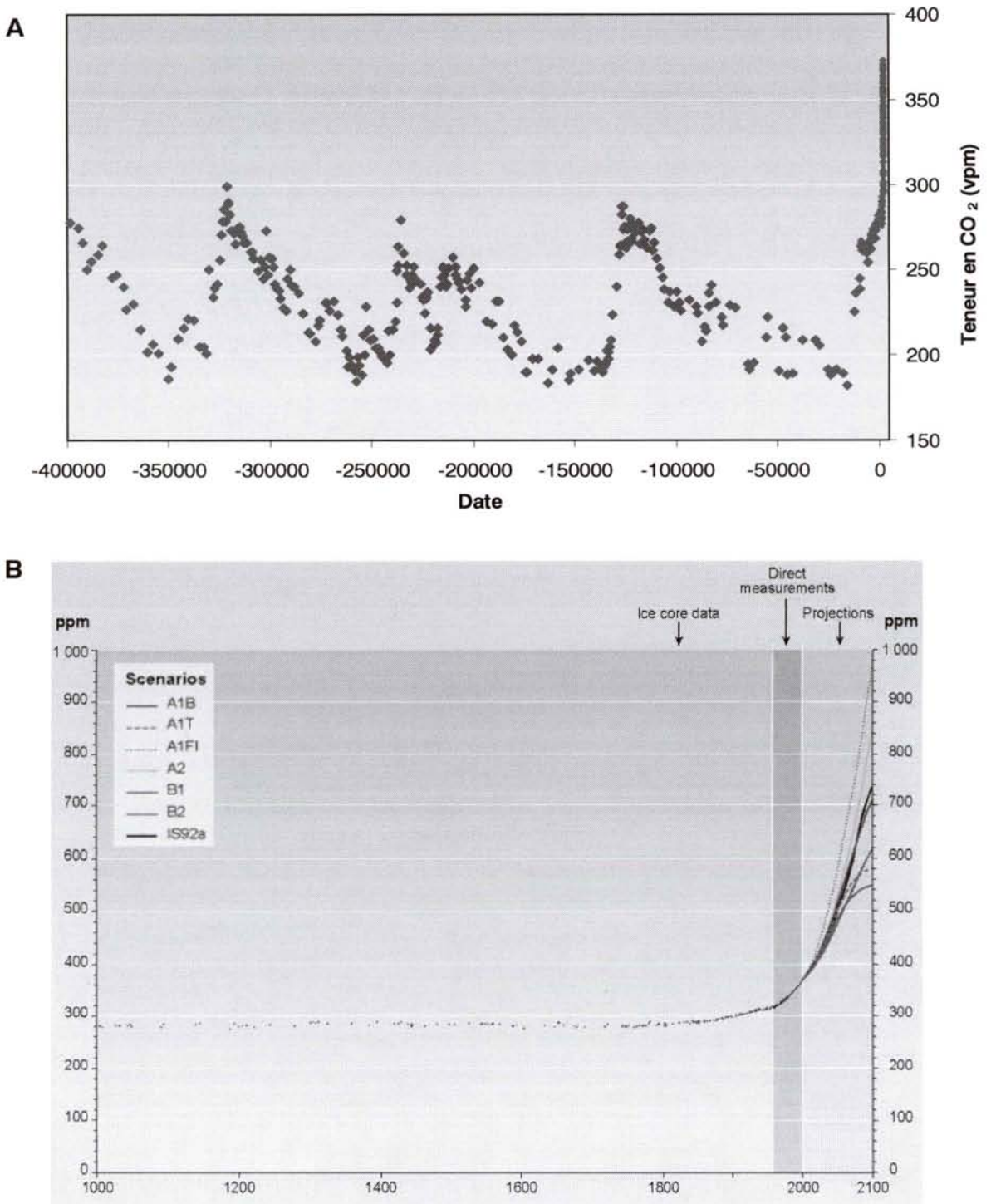


Figure 1 : Concentrations atmosphériques en CO_2 passées et présentes **A.** reconstituées à partir de données glaciaires ou d'analyses de l'air) (NOAA/CMDL *National Oceanic and Atmospheric Administration / Climate Monitoring and Diagnostic Laboratory* http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg/figures ; Friedli et al., 1986 ; Colombo & Santaguida, 1998 ; Etheridge et al., 1998 ; Indermühle et al., 1999, 2000 ; Keeling & Whorf, 2000 ; Barnola et al., 1999) et **B.** scenari envisagés par l'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change* http://www.ipcc.ch) sur les évolutions possibles de la concentration en CO_2 d'ici 2100.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CO_2 ATMOSPHERIQUE ET L'ECOSYSTEME FORESTIER

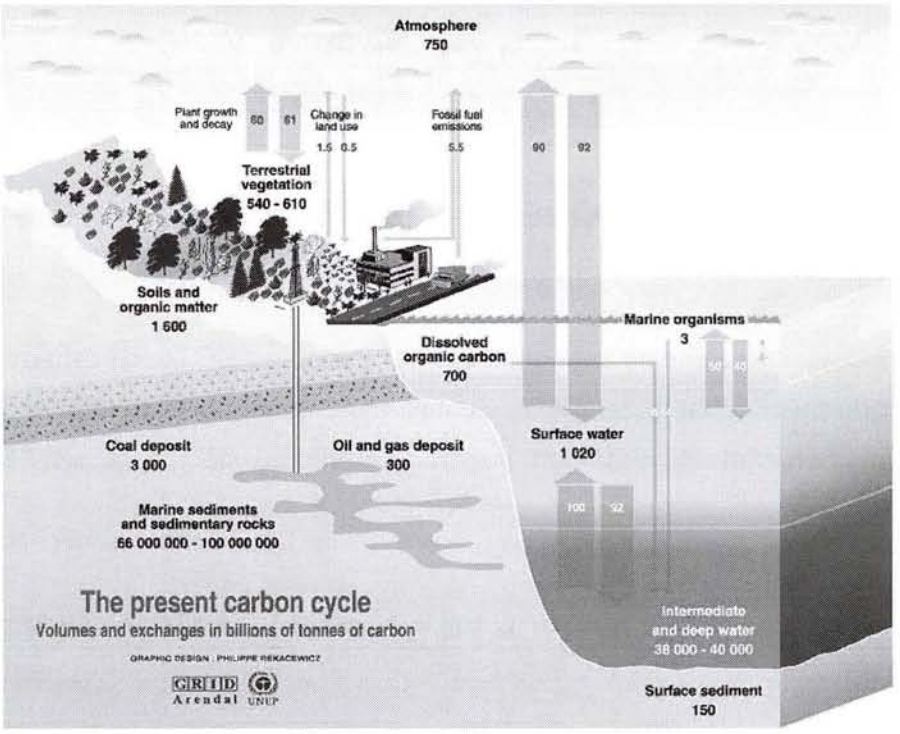
Depuis plusieurs dizaines d'années, la concentration en CO_2 dans l'atmosphère terrestre devient un sujet de préoccupation pour les scientifiques. Les teneurs atmosphériques en CO_2 mesurées augmentent en effet très nettement depuis environ deux siècles, et ce à l'échelle de la planète.

I.1. EVOLUTION DE LA TENEUR EN CO_2 DANS L'ATMOSPHERE

Les carottages glaciaires réalisés au Law Dome et à Vostok (Barnola *et al.*, 1999 ; Petit *et al.*, 1999), ainsi que les mesures instantanées effectuées dans différentes stations de mesures du globe permettent de reconstituer l'évolution de la concentration atmosphérique en CO_2 sur près de 400000 ans d'histoire de l'atmosphère (Figure 1A).

On visualise alors clairement des cycles de variation de la teneur en CO_2 avec une période moyenne de 100000 ans. Selon ces cycles, il serait normal d'observer une augmentation du $[CO_2]$atmosphérique à l'époque actuelle, mais les taux enregistrés aujourd'hui sont tout à fait particuliers dans le déroulement de ces oscillations. Durant le dernier millénaire et avant la période industrielle, la concentration atmosphérique en CO_2 n'a montré généralement que de petites fluctuations entre 280 et 285 vpm de $[CO_2]$, puis a commencé à s'élever jusqu'en 1830, tendance qui s'est ensuite fortement accélérée jusqu'à nos jours avec un net dépassement des 300 vpm sans précédent sur l'ensemble de la période d'étude (Etheridge *et al.*, 1998), atteignant 370 vpm aujourd'hui.

L'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) a prévu plusieurs scenarii pour l'évolution future du CO_2 atmosphérique, en fonction de la prise en charge du problème par les gouvernements et la réponse de l'environnement (Figure 1B). D'ici 2100, la concentration atmosphérique en CO_2 est envisagée dans une fourchette allant de 550 à 1000 vpm (scenari décrits en ANNEXE 1.). Cette évolution serait impliquée dans l'élévation globale des températures par effet de serre (Ciais, 1999 ; Indermühle *et al.*, 1999). Dans les estimations de l'IPCC (cf ANNEXE 1), il est prévu une élévation globale de la température de 1.5 à 5.5 °C d'ici 2100 du fait de l'effet de serre.



Sources: Center for climatic research, Institute for environmental studies, university of Wisconsin at Madison; Okanagan university college in Canada, Department of geography; World Watch, November-December 1998; Climate change 1995, The science of climate change, contribution of working group 1 to the second assessment report of the intergovernmental panel on climate change, UNEP and WMO, Cambridge press university, 1996.

Figure 2 : les Flux de Carbone dans l'environnement.
Données GRID-Arendal / UNEP (*United Nations Environment Programme*)
" Introduction to Climate Change " http://www.grida.no/climate/vital/13.htm

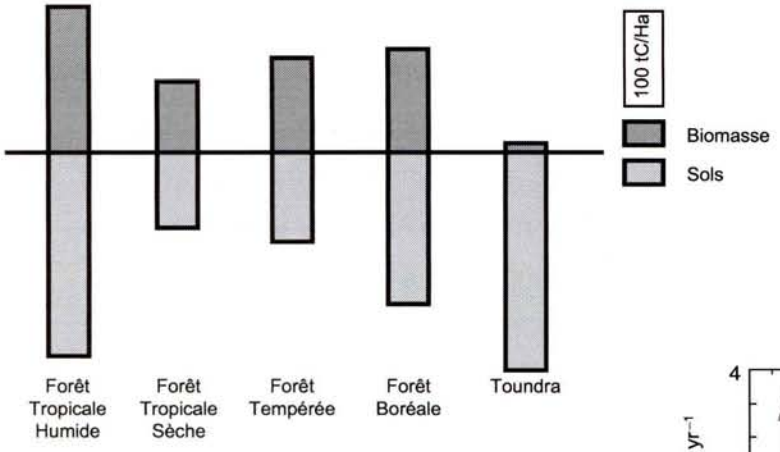


Figure 3 : Puits de Carbone (en tonne / Ha) dans les écosystèmes forestiers du globe.

D'après Lescuyer & Locatelli (1999).

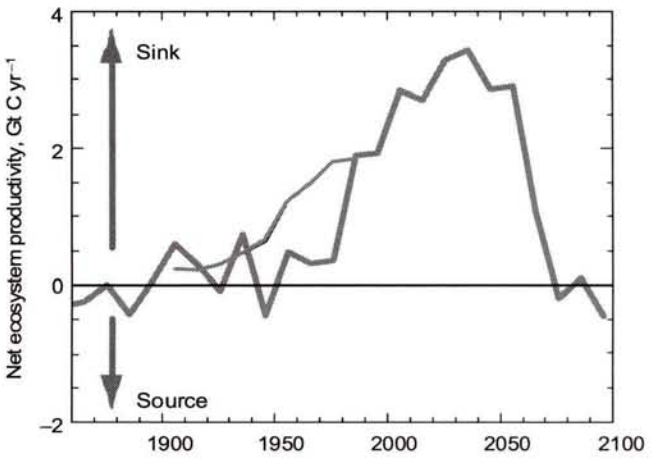


Figure 4 : Modélisation des effets de l'évolution de la concentration atmosphérique en CO_2 sur la Productivité Primaire Nette globale (stock de carbone) des écosystèmes terrestres.

Données diffusées par A.White, A.Friend & M.Cannell, NERC Institute of Terrestrial Ecology, Edinburgh. http://www.met-office.gov.uk/research/hadleycenter/pubs/brochures/B1997/vegetat.html

I.2. LES FLUX DE CARBONE DANS L'ECOSYSTEME TERRESTRE ET FORESTIER

Sur Terre, le carbone se réparti dans différents types de puits représentant, sans prendre en compte les sédiments et roches marines qui comptent 66 000 000 à 1 million de gigatonnes (1 Gt = 10^9 tonnes), un total de 44 000 à 47 000 Gt de Carbone (Figure 2). L'atmosphère et la végétation sont les deux plus petits compartiments de carbone (respectivement 750 et 540-610 Gt Carbone) (Ciais, 1999 ; Indermühle *et al.*, 1999), mais sont les principaux puits et sources actifs de CO_2.

Parmi les différents compartiments de carbone présents sur Terre, les écosystèmes forestiers sont un pool majeur : 80 % de l'ensemble du carbone présent au-dessus du sol est séquestré dans les forêts contre 40 % du carbone souterrain (Dixon *et al.*, 1994). Les forêts couvrent près de 43 % de la biosphère terrestre (Mellilo *et al.*, 1993), 10 % sont utilisés activement et 13 % sont protégés (Dixon *et al.*, 1994). L'ensemble des pools de carbone forestiers (végétation + sol) représente près de 1150 Gt de carbone (Dixon *et al.*, 1994), avec 31% du stock biosphérique de carbone localisé dans la végétation forestière (16% aux latitudes moyennes) et 69% dans les sols et la tourbe (13% aux latitudes moyennes). La taille de ces réserves de carbone varie cependant en fonction de la dynamique et de la composition forestière (Goulden *et al.*, 1996 ; Cao et Woodward, 1998), des variations du climat et du [CO2] atmosphérique (Myneni *et al.*, 1997 ; Lescuyer & Locatelli, 1999 ; Menzel & Fabian, 1999) et de la fertilité des sols (Cao & Woodward, 1998 ; Schimel, 1998 ; Nadelhoffer *et al.*, 1999).

Dans le futur, le changement de climat et de composition atmosphérique (ANNEXE 1) auront un effet certain sur la forêt, effet variable selon la durée et l'importance de ce changement et des variations des différents paramètres environnementaux (Norby & Luo, 2004) qui ne se produiront pas de façon homogène sur Terre. Bien que les forêts situées à des latitudes moyennes ne représentent encore qu'un faible réservoir de carbone pour une surface qui représente 25% de la surface forestière mondiale (Figure 3), elles sont jeunes et actuellement en expansion. White et Cannell (1999) ont considéré trois des évolutions climatiques envisagées par l'IPCC d'ici 2100. Après 2050, et quelque soit le scénario, la biomasse végétale augmenterait au-delà des 30°N avec un rallongement de la saison de végétation en réponse aux variations de concentration atmosphérique en CO_2 et au changement climatique. A l'inverse, Cao et Woodward (1998) prévoient grâce à leur modèle biogéochimique terrestre une augmentation de la production nette de l'écosystème (NPP) à relativement court terme, mais un déclin futur lié à la saturation de la biosphère en CO_2 et à l'évolution climatique (voir Figure 4), d'où l'intérêt de se pencher d'un peu plus près sur la réponse des arbres de nos latitudes, dont le chêne pédonculé fait partie, à l'évolution du [CO_2].

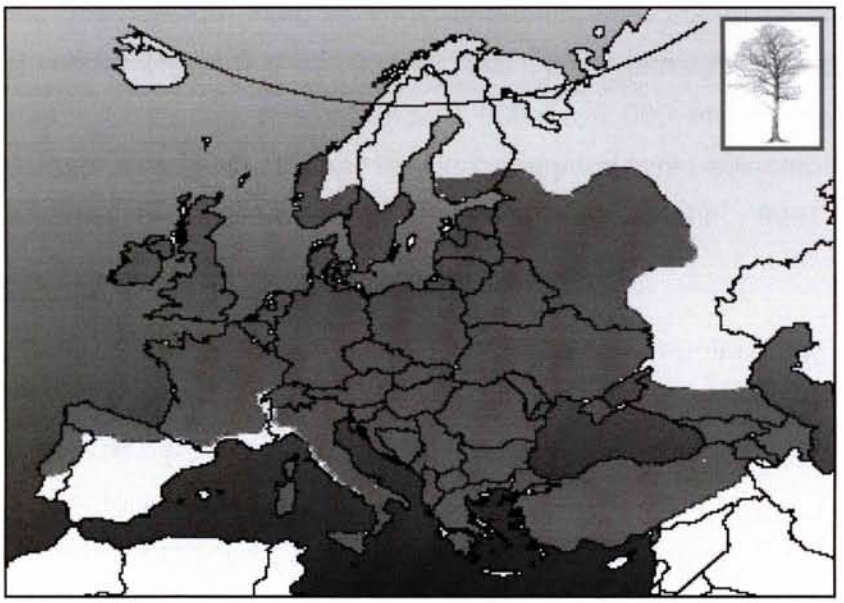


Figure 5 : Répartition du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) en Europe.
Carte disponible sur le site internet: http://www.site-en-bois.net

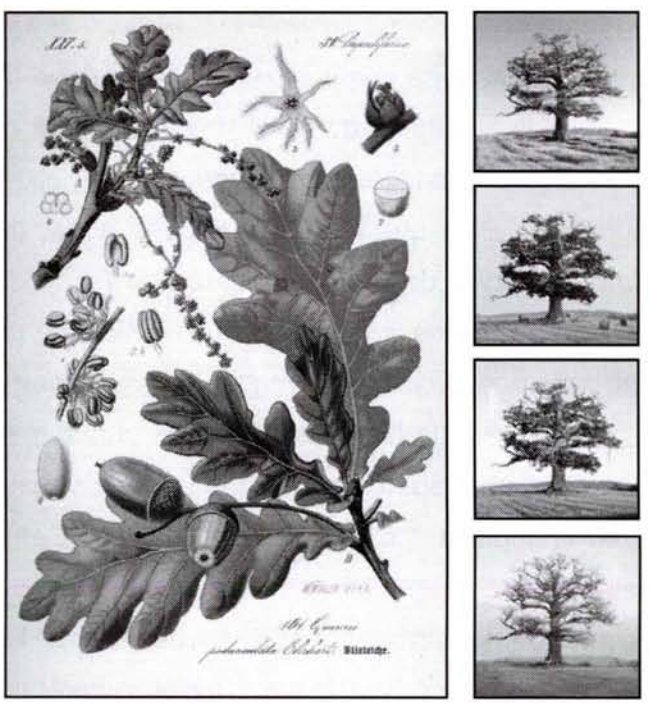


Figure 6 : Anatomie du Chêne pédonculé (*Quercus robur* L.).

II. LE CHÊNE PEDONCULE (*Quercus robur* L.)

Son aire de répartition en Europe est très étendue, allant du nord de la péninsule ibérique au sud de la Scandinavie, et à l'est par la Turquie et la partie occidentale de la Russie (Figure 5).

En France, 16,9% de la surface boisée en 1999 était occupée par des chênes – dont près de 41% étaient des chênes pédonculés.

Le chêne pédonculé est une espèce pionnière nomade de la famille des Fagacées. Il se développe préférentiellement en plaine, sur un sol riche en minéraux, compact et plutôt humide, de pH plutôt basique ou neutre (Becker & Lévy, 1990).

Il est identifiable par sa taille de 25-35 mètres, un tronc droit et une écorce profondément craquelée à l'âge adulte. Ses feuilles sont lobées avec des oreillettes à leur base, un pétiole plutôt réduit et ses glands possèdent un long pédoncule, à l'inverse du chêne sessile (Figure 6).

La forêt française représente 27 % (14,7 millions d'hectares) de la surface du territoire national, et elle est composée à 60 % de feuillus et 40 % de résineux en moyenne. Les chênes pédonculés constituent 12 % de la forêt totale en métropole – en équivalence avec les chênes sessiles et les hêtres (données 2003, IFN).

Les différentes espèces de chêne, y compris le chêne pédonculé, présentent un mode de croissance semi-déterminé : les arbres mettent en place une série d'unités de croissance ou flushs au cours de la saison de croissance, plutôt qu'une pousse unique et régulière sur l'année (Reich *et al.*, 1980). Cependant, l'organogenèse est continue, et la phase de repos du bourgeon terminal entre deux pousses n'est qu'apparente (Payan, 1982). Le nombre de pousses s'élève traditionnellement à 3, parfois 4 ou plus si les conditions environnementales sont très favorables à l'arbre (Guehl et al., 1994). La mise en place des différents étages foliaire est particulière chez ce genre végétal, car les entre-nœuds (ou tiges) ont une croissance décalée par rapport à celle des feuilles., Champagnat *et al.* (1986) décrivent par contre le système racinaire comme un puits permanent, ayant une croissance continue et régulière à l'inverse des autres organes.

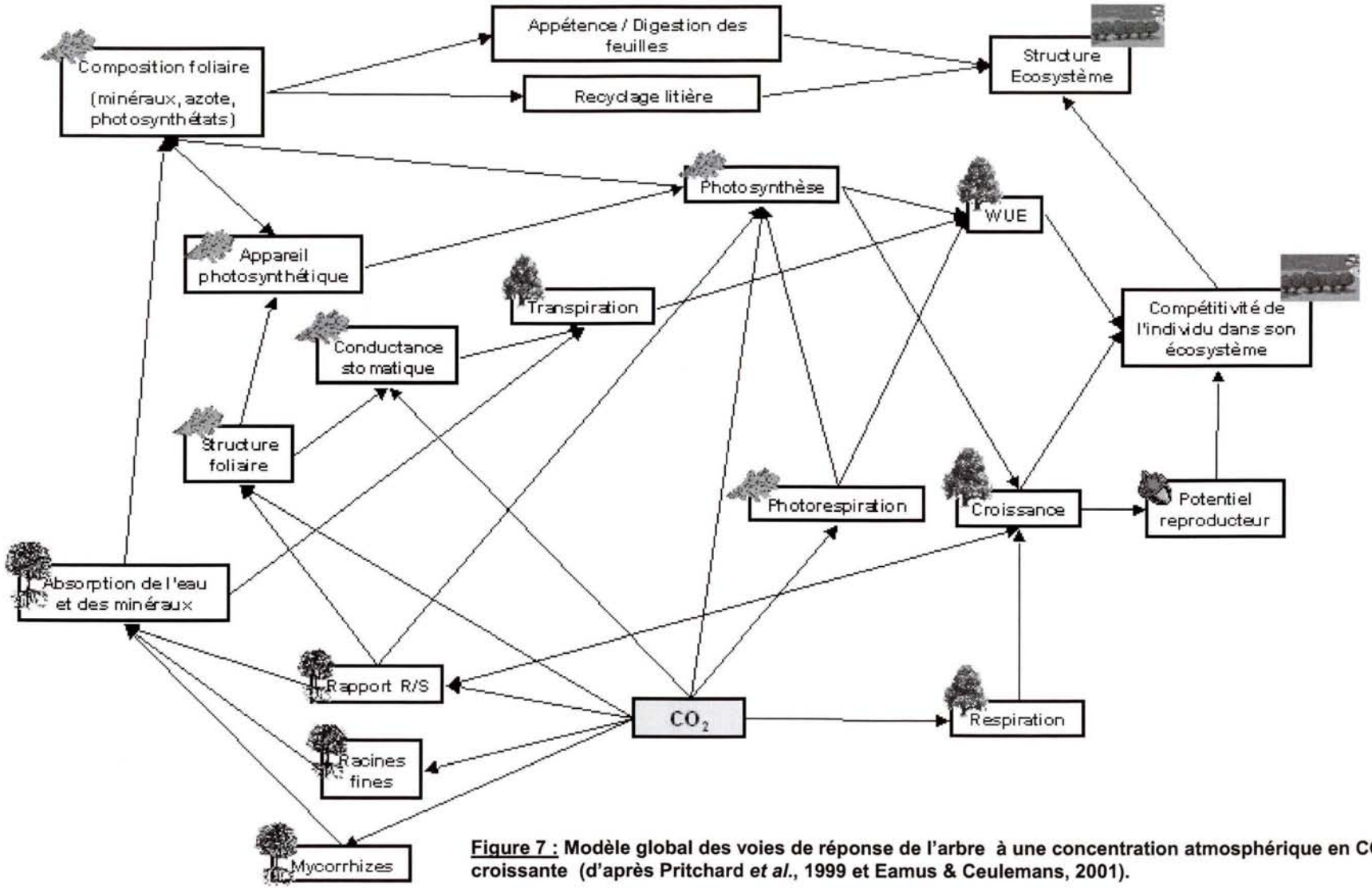


Figure 7 : Modèle global des voies de réponse de l'arbre à une concentration atmosphérique en CO_2 croissante (d'après Pritchard *et al.*, 1999 et Eamus & Ceulemans, 2001).

III. EFFET DU CO_2 ELEVE SUR LES ARBRES

Dans le cadre du changement climatique global, l'intérêt pour la capacité des arbres à stocker le carbone va croissant, sachant que leur groupe présente la plus forte réponse à l'élévation du CO_2 atmosphérique quant à la production de biomasse –et donc le stockage de carbone (Ainsworth & Long, 2005). La photosynthèse est déterminée par deux processus majeurs, qui sont l'apport en CO_2 et la capacité de carboxylation des cellules foliaires. Badeck *et al.* (1997b) ont trouvé que la conductance interne au CO_2 était plus élevée pour les arbres que pour les autres végétaux, leur conférant ainsi une plus grande capacité de réponse à une élévation du CO2 atmosphérique.

Cependant, devant l'apparente simplicité de la solution qui consiste à planter des forêts pour fixer l'excès des rejets de CO_2 dans l'atmosphère, il est nécessaire de bien connaître :

- l'influence que le [CO_2] a sur la physiologie des arbres
- la réponse qu'un arbre présente à long terme lorsqu'il est soumis à une [CO_2] élevée
- le rôle de la génétique dans la réponse des arbres au fort [CO_2].

Depuis plus de 20 ans, l'étude de l'influence du fort [CO_2] sur les végétaux a été fortement développée et de nombreuses revues et méta-analyses ont été publiées depuis (Cure, 1986 ; Mousseau & Saugier, 1992; Ceulemans, 1994; Ceulemans & Mousseau, 1994; Bowes, 1996; Curtis & Wang, 1998; Saxe *et al.*, 1998; Ceulemans *et al.*, 1999; Idso, 1999; Medlyn *et al.*, 1999; Norby *et al.*, 1999; Eamus & Ceulemans, 2001 ; Gielen & Ceulemans, 2001; Woodward, 2002; Karnosky, 2003; Urban, 2003; Ainsworth & Long, 2005). Malgré tout, tous les processus physiologiques, biochimiques ou génétiques n'ont pas encore été identifiés, et pour ceux qui ont été trouvés et analysés plus en détail, une grande variabilité de réponses au [CO_2] est généralement observée, que ce soit dû à la variabilité inter- ou intra-spécifique entre les individus étudiés, ou de leur âge.

Des modèles conceptuels ont été proposés de façon très complète et intéressante (ex. Pritchard *et al.*,1999 ; Eamus & Ceulemans , 2001) pour décrire les voies de réponses des arbres à un fort CO2 au niveau de leur structure, de leur physiologie et de leurs relations au sein de l'écosystème (Figure 7).

III.1. MODIFICATION DE LA CROISSANCE

Une évidence dans toutes les études effectuées sur l'influence du CO_2 sur les arbres est la stimulation de la croissance en hauteur sous fort [CO_2] et encore plus nettement de la biomasse produite (Curtis & Wang, 1998 ; Gielen & Ceulemans, 2001 ; Ainsworth & Long, 2005). Mousseau & Saugier (1992) soulignent le fait que les réponses les plus importantes au [CO_2] élevé sur la croissance se trouveraient plutôt chez les arbres ayant un fort potentiel de croissance, i.e. chez les arbres à croissance indéfinie ou à croissance par pousses successives, comme le peuplier ou le chêne.

Sous [CO_2] élevé, la production accrue de biomasse d'une plante est permise en partie grâce au développement simultané de sa partie aérienne et de son système racinaire, ce qui permet à l'individu de maintenir l'équilibre entre les apports de carbone et des différents nutriments utiles au soutien de son métabolisme. Un des éléments les plus intéressants à prendre en compte dans la répartition de la biomasse est ainsi le rapport R/A qui correspond au ratio de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne, dont dépend en particulier la capacité de la plante à s'acclimater ou non à une élévation du [CO_2] atmosphérique (voir paragraphe sur le phénomène d'acclimatation).

On observe que, en conditions de nutrition et d'irrigation optimales et sur des durées diverses, la répartition de la masse sèche entre les différents compartiments des plants (et en particulier le rapport R/A) ne présente généralement pas ou peu de variation si les arbres sont soumis à un fort CO_2 atmosphérique (Pettersson & McDonald, 1992 ; Guehl *et al.*, 1994 ; Gorissen *et al.*, 1995 ; Vivin *et al.*, 1995 ; Curtis & Wang, 1998 ; Gielen & Ceulemans, 2001 ; Maroco *et al.*, 2002 ; Woodward, 2002). Toutefois, en cas de déséquilibre entre les ressources (lumière, [CO_2] ou azote), les arbres auraient tendance à le compenser par un surinvestissement dirigé soit vers la croissance aérienne lorsque la disponibilité en azote est suffisante (Farrar & Williams, 1991 ; Badeck *et al.*, 1997a) ou que le volume de terre disponible pour le développement racinaire est insuffisant (Thomas & Strain, 1991), soit vers la croissance racinaire lorsque le sol est carencé ou en situation de sécheresse (Ceulemans & Mousseau, 1994 ; Badeck *et al.*, 1997a; Saxe *et al.*, 1998 ; Sigurdson *et al.*, 2001).

La croissance en hauteur de la tige est parfois stimulée, mais présente plus de variabilité selon les expériences (de + 13 à + 101 % de la hauteur en chambres, et pas ou très peu d'effet sur les arbres en plein-champ , cf. Gielen & Ceulemans, 2001). Kubiske *et al.* (1997) n'ont par exemple pas trouvé de variation de la hauteur des peupliers tremble sous fort [CO_2] par rapport au [CO_2]

ambiant, en conditions de fertilisation optimales, et Jach & Ceulemans (1999) ont observé une stimulation de la croissance en hauteur des tiges de pin sylvestre sous fort [CO_2], mais minime (<8%) la première année de mesure comparée à la deuxième année (20%). Sur les chênes, Guehl *et al.* (1994) et Vivin *et al.* (1995) ont trouvé une augmentation importante de la hauteur (près de 30%), et l'expérience d'Atkinson *et al.* (1997) montre également une différence de réponse entre les différents flushs, le troisième flush ayant une stimulation de biomasse 10 fois supérieure à celle du flush 2 sous fort [CO_2]. Une des caractéristiques généralement observées sur l'effet du [CO_2] sur la croissance en hauteur est que la stimulation initiale a tendance à ne pas se maintenir dans le temps, et présente une évolution similaire aux arbres « témoins » après quelques années de traitement (Ward & Strain, 1999 ; Lindroth *et al.*, 2001) en particulier si la fertilité du sol n'évolue pas simultanément à la concentration atmosphérique en CO_2 (Saxe *et al.*, 1998 ; Stitt & Krapp, 1999 ; Oren & Pataki, 2001 ; Woodward, 2002) ou si la physiologie des arbres subit une acclimatation au fort [CO_2] (Gorissen *et al.*, 1995).

La croissance en diamètre est moins étudiée (cf. Pritchard *et al.*, 1999), et peut être modérément stimulée sous fort [CO_2] (< 20%) ou plus fortement comme pour le chêne où elle peut être de 30% supérieure sous fort [CO_2] (Guehl *et al.*, 1994 ; Vivin *et al.*, 1995) voire doublée ou triplée (Atkinson *et al.*, 1997).

III.2. Développement foliaire

Les feuilles étant le siège principal de la réaction de photosynthèse, le développement du houppier et en particulier de la structure foliaire est un point majeur dans la réponse des arbres au fort [CO_2], avant même de rentrer dans le détail de la physiologie.

La durée de la saison de végétation est modifiée sous [CO_2] élevé, mais le sens de la variation est très variable en fonction des espèces et des expériences (Saxe *et al.*, 1998 ; Karnosky, 2003). La croissance rythmique des chênes est également perturbée par le fort [CO_2], le nombre de pousses foliaires (ou flushs) passant de 3 à 4 voire 5 pousses par an chez les jeunes plants sous fort [CO_2] (Guehl *et al.*, 1994).

Dans la majorité des expériences réalisées sur les arbres, le fort [CO_2] atmosphérique induit généralement une augmentation de la surface foliaire totale (de 14 à 59 % selon les expériences, cf. Pritchard *et al.*, 1999 ; Gielen & Ceulemans, 2001), ce qui peut être lié – en absence de contrainte nutritionnelle ou spatiale pour les racines - à l'augmentation du nombre total de feuilles par plant (Radoglou & Jarvis, 1990 ; Guehl *et al.*, 1994 ; Pritchard *et al.*, 1999 ; Polle *et al.*, 2001) et/ou à l'augmentation de la surface foliaire moyenne sous fort [CO_2] (Curtis *et al.*, 1995 ;

Gardner *et al.*, 1995 ; Lopez *et al.*, 1997). Dans plusieurs expériences, on observe aussi une stimulation de la vitesse de mise en place des feuilles (LER = Leaf Elongation Rate) chez des arbres non carencés soumis à un fort [CO_2], variable selon les espèces (Ceulemans *et al.*, 1999 ; Pritchard *et al.*, 1999, Gielen & Ceulemans, 2001, Seneweera & Conroy, 2005).

Concernant la structure même de la feuille, l'épaisseur des feuilles est généralement augmentée sous fort [CO_2] (Ceulemans *et al.*, 1999 ; Pritchard *et al.*, 1999 ; Oksanen *et al.*, 2001 ; Seneweera & Conroy, 2005 ; Tricker *et al.*, 2004). La surface foliaire spécifique (ou SLA) des arbres soumis à un fort [CO_2] ne suit cependant pas le même schéma chez toutes les espèces. Elle diminue le plus souvent sous fort [CO_2] (Pettersson & McDonald, 1992 ; Guehl *et al.*, 1994 ; Tjoelker *et al.*, 1998 a,b ; Norby *et al.*, 1999 ; liquidambar chez Hamilton *et al.*, 2001 ; Tricker *et al.*, 2004 ; Ainsworth & Long, 2005), mais peut ne pas être modifiée ou bien augmenter légèrement (Vivin *et al.*, 1996 ; Hamilton *et al.*, 2001), ou enfin répondre avec délai au fort [CO_2] (Tricker *et al.*, 2004).

III.3.Teneurs en carbone et azote dans les feuilles

Des indications importantes sont fournies par les teneurs en carbone et azote foliaires qui nous renseignent sur l'équilibre que l'arbre maintient dans sa physiologie (Saxe *et al.*, 1998 ; Norby *et al.*, 1999).

Le rapport carbone/azote (C/N) mesuré sur une plante ayant poussé sous fort [CO_2] est souvent supérieur à celui qu'elle aurait eu sous [CO_2] ambiant principalement du fait d'une concentration en azote plus faible (Mc Guire *et al.*, 1995 ; Badeck *et al.*, 1997a, Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Tjoelker *et al.*, 1998b; Hamilton *et al.*, 2001 ; Ainsworth & Long, 2005), selon ce que certains auteurs appellent le « phénomène de dilution » de l'azote (Ceulemans *et al.*, 1999). La teneur en carbone varie généralement peu, avec une concentration souvent stable dans les feuilles et parfois une légère augmentation dans les racines et les tiges, organes - puits (Guehl *et al.*, 1994), que nous pouvons attribuer à une élévation de la production en composés riches en carbone tels la lignine, les acides gras, les tannins ou phénols (Gebauer *et al.*, 1998 ; Tcherkez & Farquhar, 2005). Gifford *et al.* (2000) soulignent que le rapport C/N peut différer selon que la mesure était effectuée à des périodes différentes (croissance ou sénescence) ou à des échelles différentes. Ainsi, les redistributions de nutriments, et en particulier de l'azote, entre les organes sources et les puits de la plante sont fréquents, et on peut trouver une variation du rapport C/N au niveau de la feuille, par exemple, sans que le rapport C/N de l'individu entier ne soit

forcément modifié. Sur une saison de végétation, Vivin *et al.* (1996) trouvent par contre que le traitement [CO_2] induit une variation du rapport C/N uniquement dans les deux premiers flushs. A la fin de la saison de végétation, la redistribution de l'azote foliaire vers les tissus de réserve pourrait parfois être limitée chez les arbres ayant poussé sous fort [CO_2] atmosphérique (cf. Gifford *et al.*, 2000) – mais peu de données sont disponibles pour étayer ce constat.

Chez les arbres, ce sont les feuilles qui présentent la plus forte baisse de concentration en azote (Cotrufo et al, 1998) même si la diminution de la concentration en azote peut parfois être perçue plus ou moins nettement dans tous les organes (Guehl *et al.*, 1994). La baisse moyenne de la concentration en azote sous [CO_2] double s'échelonne approximativement de – 10 à –30% en fonction des espèces (Tissue *et al.*, 1993 ; Cotrufo *et al.*, 1998 ; Tognetti *et al.*, 1998). Il est toutefois à noter que le fort [CO_2] atmosphérique ne possède pas toujours d'effet significatif sur la concentration en azote (Lutze & Gifford, 1998), en particulier dans les cas où les plantes sont fertilisées de façon optimale et où leur croissance n'est pas limitée (Vivin *et al.*, 1995 ; Ceulemans *et al.*, 1999 ; Medlyn *et al.*, 1999). Dans ces conditions, il est parfois même possible de voir chez certaines espèces une augmentation de la concentration foliaire en azote comme pour le pin loblolly (Griffin *et al.*, 1993), le pin de Banks ou le bouleau à papier (Zhang & Dang, 2005).

L'azote est contenu essentiellement sous forme de protéines dans les feuilles et d'ammonium (Warren & Adams, 2002 ; Warren *et al.*, 2003). La quantité de protéines solubles et totales dans les feuilles est, comme l'azote, généralement réduite sous fort [CO_2] par rapport aux feuilles des arbres ayant poussé sous [CO_2] ambiant (George *et al.*, 1996 ; Gleaodow *et al.*, 1998 ; Ludewig *et al.*, 1998 ; Schmadel-Hagebolling *et al.*, 1998 ; Schwanz & Polle, 2001 ; Vu, 2005), ou ne diminue pas de manière significative sous fort [CO_2] pour d'autres espèces (Schwanz & Polle, 2001 ; Maroco *et al.*, 2002 ; Luomala *et al.*, 2003 ; Casanova-Katny *et al.*, 2005).

Pour expliquer le phénomène de dilution de l'azote au niveau foliaire, plusieurs explications sont actuellement proposées, comme :

- l'influence d'une disponibilité en azote trop faible dans le sol (Mc Guire *et al.*, 1995).
- les relations source-puits en azote entre les feuilles assimilatrices et les feuilles en croissance ou les feuilles d'ombre (Kubiske *et al.*, 1997 ; Makino *et al.*, 2000 ; Seneweera *et al.*, 2002).

- une rétrorégulation de la Rubisco (qui représente la plus grande fraction des protéines – cf. Webber *et al.*, 1994 ; Moore *et al.*, 1999) par un excès de carbohydrates afin de limiter la photosynthèse et donc d'améliorer l'efficience d'utilisation de l'azote dans les feuilles (Makino *et al.*, 1997; Saxe *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999).
- la fermeture des stomates sous fort [CO_2] qui limite les flux de sève, et donc qui entraînerait une diminution de l'absorption d'azote (Conroy, 1992), même de façon mineure (Moore *et al.*, 1999).
- l'influence de l'unité de mesure. Ceulemans *et al.* (1999) et Ainsworth & Long (2005) indiquent que la diminution de l'azote foliaire sous fort [CO_2] peut être perçue plus forte lorsqu'elle est mesurée par unité de masse que par unité de surface.

III.4. MODIFICATION DES ECHANGES GAZEUX

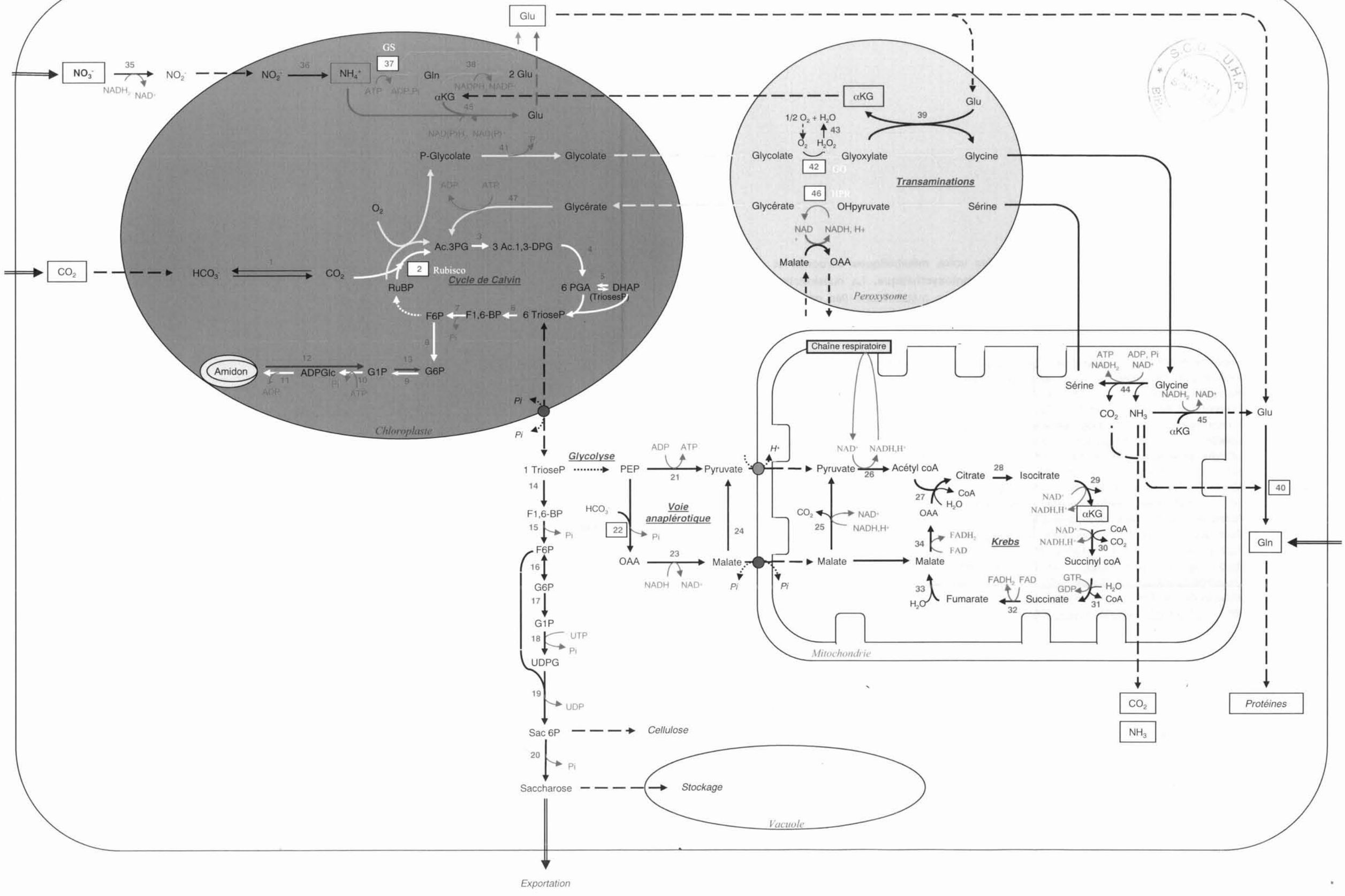
Les échanges gazeux sont à la base de la croissance des plantes et de l'ensemble des cycles du carbone et de l'azote dans la biosphère, et leur modification fait partie des premiers signes physiologiques de réponse des plantes au [CO_2].

III.4.1. Conductance stomatique

Elle détermine l'entrée du CO_2 dans la feuille, et donc la concentration interne en CO_2 que l'appareil photosynthétique aura à sa disposition pour la production de sucres (Eamus & Ceulemans, 2001).

La conductance stomatique aurait tendance à diminuer chez les plantes soumises à un fort [CO_2] (Medlyn *et al.*, 2001 ; Eichelmann *et al.*, 2004 ; Ainsworth & Long, 2005) avec une baisse moyenne de 30 à 34 % de sa valeur (Eamus & Jarvis, 1989 ; Eamus & Ceulemans, 2001). Chez les arbres, la réponse de la conductance stomatique au [CO_2] élevé serait toutefois moindre que chez les herbacées (Saxe *et al.*, 1998), la diminution de conductance pouvant même être faible voire inexistante sous fort [CO_2] dans certaines expériences (Norby *et al.*, 1999) comme pour le pin loblolly (Liu & Teskey, 1995), le tulipier ou le chêne blanc (Wullschleger *et al.*, 1992)..

Pourtant, deux grandes synthèses et études sur des arbres (Medlyn *et al.*, 2001) ainsi que sur des espèces prairiales pérennes (Lee *et al.*, 2001) ont ainsi confirmé une baisse significative de -22% en moyenne de la conductance stomatique lorsque les plantes étaient soumises à un


Glu
GS
37
NO_3^-
35
NO_2^-
36
NH_4^+
Gln
38
2 Glu
NADPH, NADP+
ATP ADP,Pi
αKG
45
Glu
NAD(P)H, NAD(P)+
P-Glycolate
41
Pi
Glycolate
ADP ATP
47
Glycérate
O_2
Ac.3PG
3
3 Ac.1,3-DPG
4
CO_2
HCO_3^-
1
CO_2
2 Rubisco
Cycle de Calvin
RuBP
6 PGA
5
DHAP
(TriosesP)
F6P
7
F1,6-BP
6
6 TrioseP
8
Pi
Amidon
12
ADPGlc
13
G1P
G6P
11
ADP
Pi
10
ATP
9
Chloroplaste
Pi
Pi
Glycolyse
1 TrioseP
14
F1,6-BP
15
Pi
F6P
16
G6P
17
G1P
18
UTP
Pi
UDPG
19
UDP
Sac 6P
Cellulose
20
Pi
Saccharose
Exportation
ADP ATP
21
PEP
Pyruvate
HCO_3^-
22
Pi
Voie anaplérotique
OAA
23
NADH NAD+
Malate
24
Pi
Pi
αKG
Glu
39
1/2 O_2 + H_2O
43
O_2 H_2O_2
Glycolate
Glyoxylate
Glycine
42
GO
Transaminations
46
HPR
Glycérate
OHpyruvate
Sérine
NAD NADH, H+
Malate
OAA
Peroxysome
Chaîne respiratoire
H^+
NAD+ NADH,H+
CO_2
25
NAD+
NADH,H+
Pyruvate
26
Acétyl coA
Citrate
27
CoA
H_2O
OAA
28
Isocitrate
29
NAD+
NADH,H+
αKG
Malate
34
$FADH_2$
FAD
Malate
Krebs
NAD+
NADH,H+
CoA
CO_2
30
Succinyl coA
33
H_2O
Fumarate
$FADH_2$ FAD
32
Succinate
GTP
GDP
H_2O
CoA
31
Mitochondrie
ATP
$NADH_2$
ADP, Pi
NAD+
Sérine
44
Glycine
$NADH_2$
NAD+
CO_2
NH_3
αKG
45
Glu
40
Gln
Protéines
CO_2
NH_3
Stockage
Vacuole

enrichissement en [CO_2] de l'air sur un long terme (2 ans et plus). Woodward (2002) évoque même la possibilité que l'effet du [CO_2] sur la conductance stomatique soit plus significatif sur le long terme que sur le court terme, ce que semblerait confirmer les observations de Bettarini *et al.* (1998) sur 17espèces exposées de manière permanente à une source de CO_2. Eamus & Ceulemans (2001) réfutent cependant l'idée d'une durabilité de l'effet du [CO_2] sur la conductance stomatique *au niveau des arbres adultes*.

Cette diminution de la conductance stomatique totale serait principalement liée à la diminution de la densité stomatique et / ou à une fermeture des stomates lorsque les feuilles sont soumises à une forte concentration en CO_2 atmosphérique (Eamus & Ceulemans, 2001; Lin *et al.*, 2001), la deuxième solution étant généralement la plus observée (Bettarini *et al.*, 1998 ; Lodge *et al.*, 2001 ; Herrick *et al.*, 2004). Ce phénomène permet à la plante de limiter les pertes en eau par évaporation, tout en ayant un apport en [CO_2] suffisamment élevé au niveau des tissus photosynthétiques pour stimuler le métabolisme de base, ce qui intervient pour une part non négligeable dans l'efficience d'utilisation en eau (WUE, Tjoelker *et al.*, 1998b ; Gielen & Ceulemans, 2001).

L'évolution du rapport entre les concentrations interne (Ci) et externe (Ca) en CO_2 lors d'une variation du Ca peut augmenter ou diminuer sous fort [CO_2] atmosphérique (Eamus & Ceulemans, 2001) ou rester relativement stable (Stitt, 1991; Pettersson & McDonald, 1992 ; Sage, 1994; Beerling, 1996 ; Bowes, 1996 ; Saurer *et al.*, 2004). Ehleringer & Cerling (1995) et Marshall & Monserud (1996) émettent une hypothèse selon laquelle il existerait un processus de régulation permettant de maintenir ce ratio à un niveau stable, peut-être grâce à un rôle actif de la photorespiration (Igamberdiev *et al.*, 2004).

III.4.2. Photorespiration

Cette voie métabolique est initiée par la fonction oxygénasique de la même enzyme que pour la photosynthèse, la Ribulose-1,5-bisphophate carboxylase / Oxygénase (Rubisco) et joue un triple rôle dans la cellule végétale (voir sa place dans le métabolisme Figure 8) : dans la capacité énergétique de la cellule et le recyclage de l'ATP et du $NADH_2$ dans les mitochondries (Amthor, 1995), à l'inverse dans la dissipation de l'excès d'énergie en limitant les flux d'électrons trop élevés lors d'un trop fort éclairement ou d'un stress (Morot-Gaudry, 1997 ; Haupt-Herting *et al.*, 2001), et dans le cycle de production des acides aminés (grâce à la synthèse de Glycine et Sérine).

La Rubisco, initiatrice de la photosynthèse et la photorespiration, présente une faible affinité pour le CO_2 (Bainbridge *et al.*, 1995). De ce fait, aux concentrations actuelles de CO_2 et de O_2 dans l'atmosphère, l'équivalent de 20% - voire 40% si l'on prend en compte tous les phénomènes cellulaires - du carbone fixé par la photosynthèse serait perdu par photorespiration (Jupin & Laman, 1997). Lorsque les plants sont placés sous CO_2 élevé, le ratio entre $[CO_2]$ et $[O_2]$ est suffisamment élevé pour que la fonction oxygénasique soit alors fortement réduite par inhibition compétitive (Webber *et al.*, 1994; Juurola, 1997; Gifford *et al.*, 2000). La diminution de la photorespiration observée sous fort $[CO_2]$ est induite également par une diminution de l'activité de la RubisCO, ainsi que des activités de la glycolate oxydase et de l'HPR (Van Oosten *et al.*, 1992; Fangmeier & Jäger, 1998) qui sont également produit en plus petite quantité (Bertoni & Becker, 1996). Enfin, Wingler *et al.* (1997) évoquent le fait que le cycle photorespiratoire peut parfois être ralenti par une accumulation de glyoxylate qui entraîne une inhibition de l'activation de la rubisco. Le glyoxylate pourrait s'accumuler lorsque la concentration en donneurs azotés (sérine, glutamate, alanine) diminue, limitant de ce fait les transaminations (Wingler *et al.*, 1997).

Sharkey (1988), Long (1991) et Fangmeier & Jäger (1998) estiment que lors d'un doublement du $[CO_2]$ atmosphérique, le ratio entre photorespiration et photosynthèse diminuerait environ de moitié au niveau foliaire. De ce fait, l'efficience de la photosynthèse sous $[CO_2]$ élevé est dans la plupart des cas stimulée, y compris par rapport à l'utilisation de ses différentes ressources (lumière, eau, carbone et azote) (Webber *et al.*, 1994; Juurola, 1997).

III.4.3. Photosynthèse

Le processus de photosynthèse est décrit par Ceulemans *et al.* (1999) comme un processus majeur en tant qu'interface active entre le $[CO_2]$ atmosphérique et les autres processus intervenant dans la plante et le sol. Pour le monde du vivant, la photosynthèse représente la première étape d'assimilation du carbone atmosphérique permettant son entrée dans le cycle du carbone biosphèrique. C'est le processus qui a été sans doute le plus étudié dans le cadre des recherches sur le changement global de la composition atmosphérique en CO_2 et les végétaux, recherches qui ont très largement montré une stimulation rapide (et précoce vis à vis des autres réponses du métabolisme) de la photosynthèse chez les arbres ayant poussé sous fort $[CO_2]$, les résultats présentés étant la majorité du temps des valeurs de photosynthèse nette (incluant les pertes de carbone par le processus photorespiratoire).

L'expérience menée sur 39 espèces d'arbres par Gunderson & Wullschleger (1994) et plusieurs revues et méta-analyses (Curtis & Wang, 1998 ; Saxe *et al.*, 1998 ; Medlyn *et al.*, 1999 ; Eamus & Ceulemans, 2001 ; Ainsworth & Long, 2005) ont montré des augmentations de taux de photosynthèse et parfois d'assimilation maximale (Amax, mesurée à saturation en lumière) allant de 44 à +60% en moyenne sous fort [CO_2], et jusqu'à 300% pour les plus fortes valeurs. Tognetti *et al.* (1998) ont ainsi trouvé une augmentation du taux de photosynthèse chez deux espèces de chêne (chêne vert et pubescent) soumis à une exposition durable des arbres au fort [CO_2] par rapport aux mêmes espèces étudiées à [CO_2] « ambiant », mesuré à différentes conductances stomatiques. Il arrive pourtant qu'aucune augmentation des valeurs de photosynthèse ne soient constatée malgré l'élévation de la concentration en CO_2 dans l'air, comme dans l'expérience de Tuhkanen *et al.* (1997) sur des pins sylvestres.

Pour d'autres expérience, la photosynthèse maximale est au contraire abaissée après quelques temps passés sous fort [CO_2] après une stimulation initiale (ex. : Le Thiec & Dixon, 1996; Rey & Jarvis, 1997). Afin d'estimer la réponse de la photosynthèse au fort [CO_2] à court et à long terme, Ceulemans *et al.* (1999) conseillent, pour deux échantillons d'arbres (témoins et enrichis en CO_2), de mesurer si possible la photosynthèse à la concentration en CO_2 de croissance pour estimer l'effet à court terme du gaz sur le métabolisme (sans pour autant prédire l'évolution des structure et composition des végétaux), et à une même concentration en [CO_2] pour estimer l'effet d'acclimatation. Il semblerait ainsi que, pour une concentration en CO_2 identique pour les deux mesures, la photosynthèse des plants ayant poussé sous fort [CO_2] soit très souvent inférieure à celle des individus ayant poussé sous [CO_2] ambiant, ce qui révèle clairement une diminution de la capacité photosynthétique absolue lors d'une exposition prolongée des plantes à un [CO_2] élevé (Sicher & Kremer, 1996).

Selon Ceulemans & Mousseau (1994), la réponse de la photosynthèse dépend en partie du type d'arbre étudié, les conifères répondant plus favorablement au [CO_2] que les décidus sur une saison de végétation. L'étude menée par Tjoelker *et al.* (1998a,b) sur plusieurs espèces boréales d'arbres précise que la différence de réponse entre les espèces dépend du mode de croissance lente (pin, épicéa et mélèze) ou rapide (peuplier et bouleau) des espèces, la photosynthèse des premiers étant plus fortement stimulée par le fort [CO_2] que pour les seconds. Toutefois, Saxe *et al.* (1998) ne retrouvent pas dans leur revue de différence significative entre les deux groupes lorsque la fertilisation est optimale (50 à 60% d'augmentation de la photosynthèse sous fort [CO_2]).

III.4.4. Respiration

C'est un élément important dans la réponse des végétaux à l'élévation du [CO_2], puisque la respiration peut consommer jusqu'à la moitié du carbone fixé par la photosynthèse (Amthor, 1995).

Un effet précis du fort [CO_2] sur la respiration semble encore difficile à mettre en évidence, et de nombreuses expériences montrent des résultats contradictoires en fonction des expériences et des espèces étudiées concernant la réponse directe de la respiration (Wullschleger *et al.*, 1994 ; Saxe *et al.*, 1998 ; Hamilton *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2004) ou à plus long terme (Eamus & Ceulemans, 2001). Toutefois, il semblerait que ce soit une diminution de la respiration qui soit constatée le plus souvent lors de la croissance des plantes sous fort [CO_2] atmosphérique (Curtis & Wang, 1998; Idso, 1999; Norby *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002; Gonzalez-Meler *et al.*, 2004), les rôles respectifs des respirations de croissance et de maintenance étant controversé dans ce cas-là (Ryan, 1991 ; Hamilton *et al.*, 2001).

Ceulemans *et al.* (1999) considèrent cependant que, même dans les cas où la respiration exprimée par unité de masse foliaire est diminuée significativement ou non par une élévation du [CO_2] atmosphérique, l'élévation de la biomasse produite par l'arbre dans ces conditions peut être suffisante pour induire une augmentation nette des pertes respiratoires à l'échelle de l'individu entier.

III.5. Modification du $\Delta^{13}C$ et de l'efficience d'utilisation de l'eau (WUE)

L'efficience d'utilisation de l'eau, au niveau de la plante, correspond à la quantité de biomasse accumulée rapportée à la quantité d'eau utilisée (Eamus, 1991). C'est donc un facteur essentiel pour les arbres, puisqu'elle détermine leur capacité à produire de la biomasse et à grandir tout en limitant au maximum les besoins et les pertes en eau, point d'autant plus important que, dans le cadre de l'évolution environnementale actuelle, les arbres vont avoir à faire face à une augmentation de la teneur en CO_2 dans l'atmosphère, et à la fois à une multiplication des épisodes de sécheresse.

Elle peut être calculée de deux manières différentes, qui sont complémentaires dans les informations qu'elles apportent.

- soit elle est calculée au niveau intrinsèque comme le rapport entre l'assimilation carbonée sur la transpiration, ou, au niveau intrinsèque et instantané, comme le rapport entre l'assimilation carbonée nette et la conductance stomatique à la vapeur d'eau.
- soit elle est calculée à partir des mesures de discrimination isotopique contre le $^{13}CO_2$ ($\Delta^{13}C$) réalisées sur la plante (Farquhar & Richards, 1984). La formule donne une relation positive entre l'efficience d'utilisation de l'eau et la concentration atmosphérique en CO2 (Ca), et négative entre l'efficience et la discrimination contre le ^{13}C (voir ANNEXE 2). Cette méthode donne une approche plus intégrative de la WUE au niveau du temps (Farquhar *et al.*, 1989), basée sur l'accumulation des composés carbonés qui ont « mémorisé » les variation de photosynthèse et conductance stomatique grâce à leur teneur en isotopes stables du carbone.

Les multiples expériences ayant porté sur l'efficience d'utilisation de l'eau ont montré de façon assez unanime une augmentation de l'efficience d'utilisation en eau sous fort [CO_2] atmosphérique, avoisinant les 50% d'augmentation lors d'un doublement du [CO_2] atmosphérique (Eamus & Jarvis, 1989 ; Norby & O'Neill, 1989 ; Pettersson & McDonald, 1992 ; Gunderson *et al.*, 1993 ; Ceulemans & Mousseau, 1994 ; Guehl *et al.*, 1994; Le Thiec & Dixon, 1996; Picon *et al.*, 1996a, 1997; Saxe *et al.*, 1998; Tjoelker *et al.*, 1998; Gielen & Ceulemans, 2001; Lodge *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Greenep *et al.*, 2003; Ainsworth and Long, 2005), y compris sur un très long terme (Polley *et al.*, 1993 ; Beerling, 1996 ; Saurer *et al.*, 2004).

Pour certains auteurs, l'efficience d'utilisation en eau calculée à partir des échanges gazeux semblerait être préférentiellement liée à l'augmentation de la production de biomasse par seule stimulation de la photosynthèse (ou à une limitation des pertes carbonées par la respiration), car la transpiration totale de l'arbre n'est parfois pas modifiée sous fort [CO_2] (Norby *et al.*, 1986 ; Gorissen *et al.*, 1995 ; Lopez *et al.*, 1997). Mais, dans la plupart des cas, elle est stimulée sous fort [CO_2] grâce à la fois à une augmentation de l'assimilation carbonée et une diminution de la conductance stomatique (Eamus, 1991 ; Gunderson *et al.*, 1993 ; Lodge *et al.*, 2001). Wullschleger *et al.* (2002) rajoutent aussi l'éventualité d'un rôle positif du développement du système racinaire et d'une amélioration de la conductance de la sève dans l'arbre sur la WUE finale.

Plusieurs expériences montrent également une augmentation de l'efficience d'utilisation de l'eau calculée à partir des données de discrimination ou de Ci/Ca (Sun *et al.*, 1996 ; Saurer *et al.*, 2004). Toutefois, les études portant sur l'effet d'une élévation [CO_2] atmosphérique sur la discrimination isotopique contre le ^{13}C montrent des résultats variables en fonction des types de protocoles expérimentaux et des espèces étudiées. Un fort [CO_2] induit ainsi soit une augmentation de la discrimination (Picon *et al.*, 1996b ;Penuelas & Estiarte, 1997 ; Miglietta *et al.*, 1998), soit aucune variation significative (Farquhar *et al.*, 1982 ; Vivin *et al.*, 1995 ; Picon *et al.*, 1997 ; Roumet, 2000) ou plus rarement une diminution de la discrimination (Beerling, 1997). Pour des études à plus long terme, une légère -mais non significative- hausse de discrimination est généralement observée (Penuelas & Azcon-Bieto, 1992 ; Ehleringer & Cerling, 1995 ; Beerling, 1996 ; Nguyen-Tu *et al.*, 2004). Ehleringer & Cerling (1995), Ponton *et al.* (2001) et Nguyen-Tu *et al.* (2004) font le bilan que, parmi ces expériences, les différences d'espèces, de conditions expérimentales, de stress appliqués ou de durée d'étude interviennent certainement dans la variabilité de réponses observée, ainsi qu'un déterminisme génétique important lié à plusieurs mécanismes comme les échanges gazeux impliqués dans la discrimination.

Le principal problème – et avantage - posé par les mesures de discrimination sur du matériel foliaire est celui de leur représentativité au niveau temporel. En effet, la discrimination mesurée sur les feuilles est une donnée intégrative, à savoir que les composés carbonés sont de deux types : structural (composés de la paroi, composés aromatiques…) ou transitoires (-de réserve- sucres ou amidon exportés…). La signature isotopique diffère entre les différents composés foliaires, et toute modification de leur proportion dans la feuille par le fort [CO_2] va jouer sur la discrimination finale mesurée. La lignine étant entre autres moins riche en ^{13}C que la cellulose (Loader *et al.*, 2003), la variation de la proportion entre les deux composés dans les cellules peut jouer sur la discrimination finale de l'ensemble. Lors d'un prélèvement de feuilles, la discrimination mesurée intègre donc les différents pools de carbone, et une analyse de discrimination sur un court terme peut ainsi être biaisée par la présence en grande quantité de carbone structural dans les feuilles proportionnellement au carbone transitoire (Brendel, 2001). Les espèces à feuilles caduques sont moins concernées que les arbres à feuilles persistantes par ce problème, les renouvellement du carbone structural se faisant chaque année. Les mesures réalisées sur la cellulose du bois sont plus intégratives, puisque le carbone utilisé pour la formation du bois (cellulose et lignine) est ainsi immobilisé (Brendel *et al.*, 2003). L'étude des cernes permet donc d'intégrer les processus stomatiques et photosynthétiques sur la saison, et révèlent également les conditions environnementales du moment auxquelles répond le métabolisme (Hemming *et al.*, 1998 ; McCarroll & Loader, 2004).

III.6. Le phénomène d'acclimatation au fort [CO_2] atmosphérique

Il arrive parfois que l'effet initial du fort [CO_2] sur la photosynthèse ne soit plus trouvé après quelques années, voire seulement quelques mois, de traitement au [CO_2] selon un phénomène appelé « acclimatation » (Arp, 1991 ; Gunderson & Wulllschleger, 1994 ; Sage, 1994 ; Webber *et al.*, 1994 ; Le Thiec & Dixon, 1996 ; Vivin *et al.*, 1996 ; Tjoelker *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2001 ; Lewis *et al.*, 1999 ; Lodge *et al.*, 2001 ; Woodward, 2002), comme observé sur de jeunes chênes pédonculés après plusieurs mois d'expérience (Vivin *et al.*,1995). Dans certains cas, comme pour *Quercus myrtifolia*, la sensibilité de la conductance stomatique au [CO_2] atmosphérique peut, elle aussi, faire l'objet d'un processus d'acclimatation (Lodge *et al.*, 2001) ainsi que la respiration (Juurola, 1997).

III.6.1. Le processus d'acclimatation

L'acclimatation est généralement envisagée comme la conséquence d'une rétro - régulation du métabolisme sur la capacité des arbres à assimiler le carbone (Ceulemans *et al.*, 1999), et ne semble pas induite par un seul facteur majeur mais dépend des espèces étudiées et surtout des stress éventuels qu'elles peuvent subir (Gunderson & Wullschleger, 1994 ; Saxe *et al.*, 1998) ainsi que de la période de leur développement pendant laquelle sont faites les mesures (voir le rôle des saisons dans Eamus & Ceulemans, 2001). Deux principaux phénomènes sont à l'origine de l'acclimatation : les relations source - puits dans la plante, et la disponibilité en eau et nutriments et en particulier en azote dans le sol.

- *Les relations sources-puits* : une des contraintes majeures dans la plante est de pouvoir ajuster la production de composés carbonés à la demande de ses différents organes. Lorsque la quantité de sucres produits dépasse la demande des puits, la plante doit pouvoir transitoirement les stocker (en général sous forme d'amidon), ou en dernière limite ralentir son métabolisme de base afin d'éviter que la surabondance de grains d'amidon dans les cellules photosynthétiques (Wang *et al.*, 2004) n'entraîne une modification de l'intégrité structurale des chloroplastes ou de leurs capacités physiologiques (cf. Stitt, 1991; Tissue *et al.*, 1993) comme cela risque de se produire sous fort [CO_2] (Webber *et al.*, 1994). Le développement du système racinaire serait particulièrement impliqué dans ce phénomène (Ceulemans & Mousseau, 1994 ; Gorissen *et al.*, 1995), et le blocage de son développement par l'utilisation de pots trop étroits entraînerait ainsi presque invariablement un phénomène

d'acclimatation de la photosynthèse (Curtis & Wang, 1998 ; Eamus & Ceulemans, 2001), ce qui n'est généralement pas constaté pour les végétaux en pleine terre (Gunderson *et al.*, 1993 ; Curtis & Wang, 1998 ; Medlyn *et al.*, 1999 ; Eamus & Ceulemans, 2001 ; Sholtis *et al.*, 2004) sauf dans quelques cas (Rey & Jarvis, 1997 ; Tjoelker *et al.*, 1998a ; Ainsworth & Long, 2005). Le phénomène d'acclimatation serait aussi plus net chez les espèces ayant une moindre capacité à créer de nouveaux puits de stockage des carbohydrates comme les espèces à croissance rapide (Tjoelker *et al.*, 1998a,b ; Ceulemans *et al.*, 1999), et inversement l'acclimatation serait évitée lors des périodes de fructification (cf. Eamus & Ceulemans, 2001; Lewis *et al.*, 2002). L'efficacité de l'exportation des sucres – chargement et circulation des sucres dans le phloème - pourrait enfin intervenir dans l'acclimatation (Poorter *et al.*, 1997 ; Saxe *et al.*,1998 ; Pritchard *et al.*, 1999 ; Eamus & Ceulemans, 2001), ainsi que la distance à parcourir pour les sucres jusqu'aux différents puits (Kubiske *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999).

- *Les carences subies* : les facteurs environnementaux limitants, comme la disponibilité en azote et minéraux pour la plante sont également des facteurs d'acclimatation pour les plantes (Badeck *et al.*, 1997; Ceulemans *et al.*, 1999 ; Ishii *et al.*, 2003). Celle-ci est généralement moins nette chez arbres ayant poussé sur un sol enrichi en azote ou légèrement carencé par rapport aux arbres subissant une forte carence (Curtis *et al.*, 1995 ; Guehl et al., 1995 ; Kubiske et al., 1997 ; Maillard et al., 2001 ; Ainsworth & Long, 2005). Les carences en phosphore impliqueraient une régulation plus légère de la photosynthèse qu'une carence en azote (Tissue *et al.*, 1993). Le but de cette acclimatation serait donc de maintenir un équilibre entre les différentes ressources disponibles pour la plante, en particulier pour celles qui seraient allouées à la photosynthèse dont le système de collecte lumineuse et la Rubisco qui représente le pool d'azote le plus important dans les feuilles (Yelle *et al.*, 1989 ; Gunderson & Wullschleger, 1994 ; Ainsworth & Long, 2005).

Au niveau biochimique, l'acclimatation semble principalement associée à une diminution de l'activité et / ou de la quantité de Rubisco et des systèmes de collecte lumineuse (Sage, 1990 ; Badeck *et al.*, 1997a ; Saxe *et al.*, 1998), avec peut-être une réorganisation de l'azote foliaire vers les systèmes limitants pour la photosynthèse (Moore *et al.*, 1999), ou enfin à une rétrorégulation plus ou moins directe des photosynthétats produits en excès sur le système photosynthétique, dont la rubisco (Moore *et al.*, 1998, 1999 ; Stitt & Krapp, 1999 ; Liozon *et al.*, 2000 ; Nowak *et al.*, 2004 ; Ainsworth & Long, 2005).

III.6.2. Les facteurs environnementaux pouvant intervenir dans l'acclimatation

En observant les causes possibles d'acclimatation, il apparaît clairement que toute variation des conditions environnementales peut être impliquée dans ce phénomène, que ce soit un stress négatif ou positif pour l'arbre. Les principaux facteurs environnementaux impliqués sont :

- *la température*

La revue de Eamus & Ceulemans (2001) montre que les effets de la température combinée à une élévation du [CO_2] sur la physiologie des arbres ne sont pas standardisés, que basse température ne rime pas forcément avec limitation de cette réponse (cf. Tissue *et al.*, 1997) ni températures douces avec stimulation de la réponse (cf.Tjoelker *et al.*, 1998), et que la photosynthèse ne montre pas la même sensibilité à forte température et [CO_2] faible qu'à basse température et fort [CO_2] (cf. Kirchbaum, 1994). Pour Norby & Luo (2004), toute élévation des deux facteurs a malgré tout comme conséquence une augmentation de l'assimilation nette ainsi qu'un déplacement du seuil de fonctionnement optimal vers les températures plus élevées (cf. Long, 1991). Au niveau foliaire, la diminution de la quantité ou de l'activité de la rubisco provoquée par un abaissement de la température ferait que, malgré une forte concentration atmosphérique en [CO_2], la photosynthèse pourrait être réduite (Webber *et al.*, 1994; Warren *et al.*, 2000). Saxe *et al.* (1998) et Jach & Ceulemans (1999) indiquent enfin qu'un fort [CO_2] peut modifier la durée de la saison de végétation et donc les rapports entre sources et puits de carbone, mais le sens de la modification n'est pas le même en fonction des expériences.

- *La disponibilité en eau*

Le fait que, sous fort [CO_2], les arbres aient une meilleure efficience d'utilisation de l'eau et une croissance stimulée entre autres au niveau du système racinaire -favorisant ainsi le réseau de collecte d'eau- peut représenter un avantage non négligeable face à une sécheresse (Guehl *et al.*, 1994 ; Picon *et al.*, 1996a), mais à l'inverse, l'augmentation de la surface foliaire totale peut augmenter la surface de déperdition en eau à l'échelle de l'individu entier.

Tognetti *et al.* (1998) estiment que les plantes ayant poussé longtemps à proximité d'une source de CO_2 ont adapté la réponse de la capacité photosynthétique au rythme de variation du potentiel hydrique de la plante dans la journée. Deux éléments peuvent en partie expliquer cela, à savoir que lors d'une sécheresse, la fermeture des stomates peut entraîner une hausse du rapport entre oxygénation et carboxylation au niveau de la Rubisco (Douce & Neuburger, 1999 ; Haupt-Herting *et al.*, 2001).L'augmentation de la quantité de sucres dans les feuilles souvent

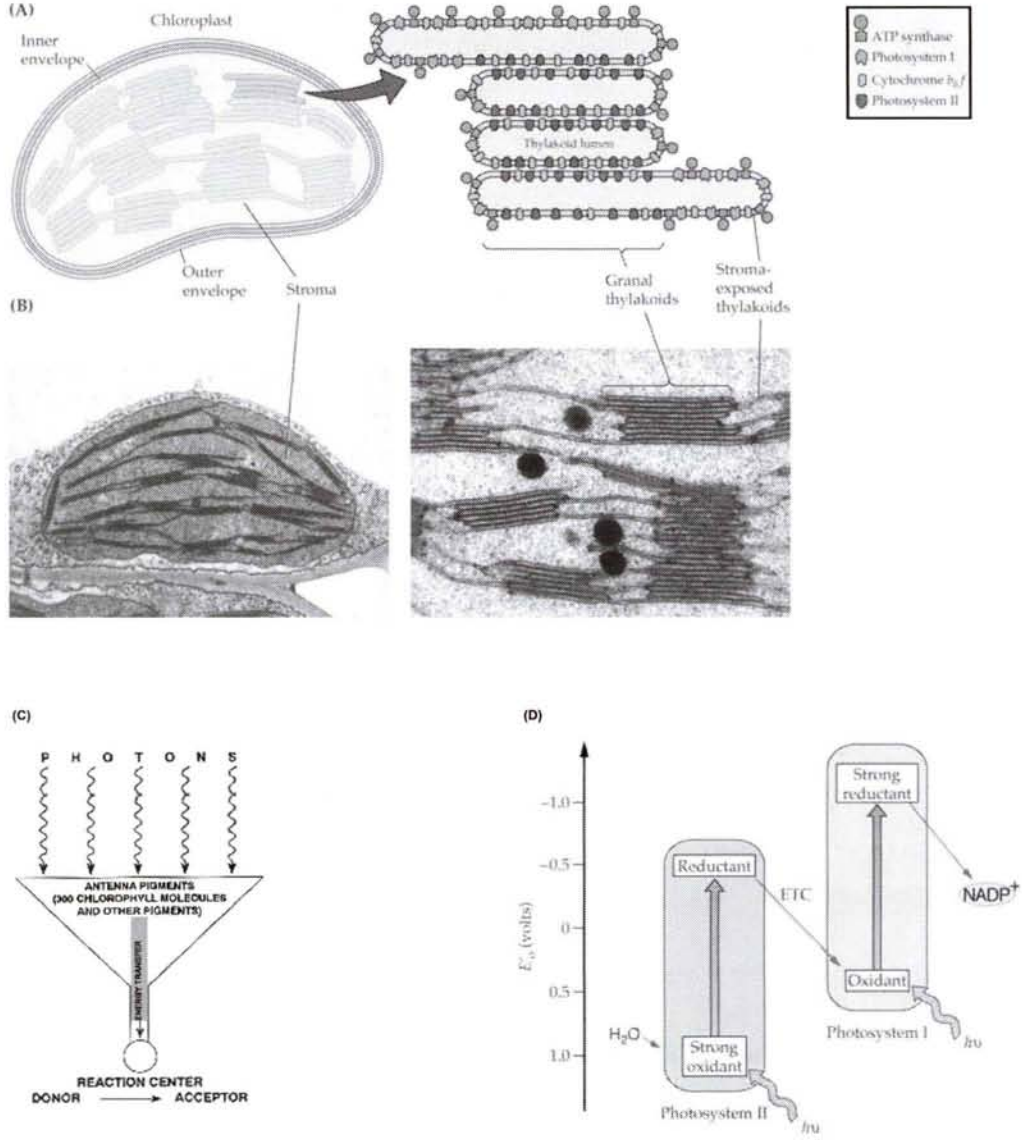
observée sous fort [CO_2] pourrait être également intéressante en cas de déficit hydrique, en permettant d'abaisser le potentiel osmotique des cellules en plus de la réponse traditionnelle des feuilles à la sécheresse (Eamus & Ceulemans, 2001 ; Wullschleger *et al.*, 2002).

➢ *L'éclairement*

Au niveau de la réponse de la photosynthèse à une concentration croissante en [CO_2], une augmentation de la luminosité induirait une nette augmentation de la valeur maximale de photosynthèse (Sage *et al.*, 1990). L'influence du [CO_2] élevé se portant entre autres sur la répartition de l'azote dans le système photosynthétique avec un investissement accru dans les systèmes de collecte lumineuse pour les environnements plus ombragés comme pour les branches situées dans le bas de la canopée (Kubiske *et al.*, 1997 ; Saxe *et al.*, 1998 ; Warren & Adams, 2001), on peut s'attendre à ce que, dans la canopée, les phénomènes d'acclimatation dans les feuilles de lumière soient plus nets que lorsqu'un arbre est élevé en serre avec un éclairement maximal reçu par la grande majorité du feuillage. Les arbres intolérants à l'ombre ne réagissant pas au fort [CO_2] avec la même intensité que les arbres tolérants, on pourrait imaginer alors une réorganisation des espèces présentes en forêt dans le futur en réponse au changement global (Saxe *et al.*, 1998).

➢ *La pollution*

L'effet de polluants comme l'ozone sur la réponse des arbres au fort [CO_2] et l'acclimatation du système photosynthétique n'est pas encore très clair, tous les cas de figure étant observés dans les expériences et les effets des deux composés n'étant pas additionnels (Kellomäki & Wang, 1997 ; Ceulemans *et al.*, 1998 ; Eichelmann *et al.*, 2004). Ainsworth & Long (2005) ont tout de même observé une stimulation accrue de la photosynthèse maximum (en lumière saturante) lorsque les deux gaz étaient combinés. Schmadel-Hagebölling *et al.* (1998) analysent plus en détail les effets d'une combinaison entre ozone et fort [CO_2] sur de jeunes chênes, et trouvent que la présence de l'ozone limite la diminution de production de rubisco constatée sous fort [CO_2], alors qu'elle a plutôt tendance à faire diminuer celle-ci sous [CO_2] ambiant, mais semble par contre entraîner une limitation des apports azotés vers la feuille (Schmadel-Hagebölling *et al.*, 1998) ce qui ramène à un problème de carence nutritionnelle.



<u>Figures 9A,B,C,D:</u> Organisation des systèmes de collecte lumineuse dans les feuilles. A: Schémas montrant la structure des chloroplastes et la composition des thylakoïdes qu'ils renferment. B: Ultrastructure des chloroplastes (microscopie par transmission d'électrons). C: Schéma conceptuel des photosystèmes, composés d'une antenne collectrice de lumière (composée de complexes protéines / pigments -chlorophylles *a*, *b* ou caroténoïdes) et d'un centre réactionnel (composé d'un petit nombre de complexes protéines / chlorophylle *a*). Remarque: le rapport Chlorophylle *a* / Chlorophylle *b* est plus élevé dans les PSI que dans les PSII. **D: Schéma conceptuel "en Z" montrant la coopération entre les Photosystèmes I et II dans le transfert d'électrons depuis l'eau jusqu'au $NADP^+$.**

Les figures A, B et D ont été tirées du recueil "Biochemistry & Molecular Biology of plants" (2001), Buchanan, Gruissem & Jones (eds.); American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA.

III.7. MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES DU METABOLISME FOLIAIRE

Lorsqu'on regarde un peu plus en détails les réponses de la physiologie au [CO_2] élevé, on trouve de nombreuses modifications biochimiques en cause, dont les principales sont les réorganisations subies par le système photosynthétique, et plus particulièrement la collecte lumineuse et les premiers points de départ des métabolismes carboné et azoté primaires dans les feuilles.

Les organites cellulaires impliqués directement dans ces voies métaboliques sont eux-mêmes touchés par l'élévation de la concentration en CO_2 atmosphérique. Ainsi, le nombre et la taille des chloroplastes augmente aussi généralement sous fort [CO_2] de façon identique à la photosynthèse (Yelle *et al.*, 1989a; Oksanen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). A l'inverse des chloroplastes, aucune corrélation n'est observée entre l'augmentation seule du nombre de mitochondries et la respiration (Griffin *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2004) suggèrent donc que l'efficience du système photosynthétique est augmentée sous fort [CO_2], ce qui est visible déjà par le fait que le rapport entre le nombre de chloroplastes et celui de mitochondries diminue de 36% en doublant la concentration atmosphérique en CO_2.

III.7.1. Réorganisation de la collecte lumineuse

Les photosystèmes I et II (PS I et PS II) sont à l'origine la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, base essentielle pour le règne du vivant (Figure 9). Ils contiennent en particulier les pigments photosynthétiques qui réalisent la conversion entre les deux types d'énergie au sein des antennes collectrices.

L'étude réalisée sur le bouleau par Eichelmann *et al.* (2004) montre que, sous fort [CO_2], les feuilles contiennent généralement moins de PS II par unité de surface, de façon variable selon les génotypes étudiés. La densité de PS I est par contre diminuée très progressivement et de façon similaire pour tous les génotypes sous [CO_2] élevé. Pour les deux photosystèmes, les jeunes pousses présentent à peu près le même schéma que les pousses âgées, avec un écart plus net entre les deux traitements [CO_2] pour le PS I. L'efficience énergétique semble particulièrement stimulée par le fort [CO_2] plus particulièrement dans les jeunes feuilles (Cousins *et al.*, 2001), même si l'évolution des PS I et II est la même pour des feuilles plus âgées soumises à la même concentration en CO_2.

Excepté dans quelques cas comme pour le pin sylvestre où il n'y a pas de variation de leur concentration (Jach & Ceulemans, 1997 ; Maroco *et al.*, 2002), les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes diminuent généralement sous fort [CO_2] (Wullschleger *et al.*, 1992, 1997 ; Tissue *et al.*, 1993 ; Müller *et al.*, 1997 ; Eichelmann *et al.*, 2004). Cette baisse est plus nette par unité de masse que par unité de surface (Ainsworth & Long, 2005), montrant une relative stabilité dans la répartition des pigments dans la surface de la feuille. L'expérience de Epron *et al.* (1996) sur le hêtre a également montré une diminution de la quantité de chlorophylle lorsqu'elle est exprimée par gramme d'azote, la feuille réagissant donc à l'élévation du [CO_2] atmosphérique en diminuant son investissement en azote dans le système de collecte lumineuse sans provoquer de réduction de la photosynthèse finale (Wullschleger *et al.*, 1992 ; Badeck *et al.*, 1997a ; Saxe *et al.*, 1998). Pourtant, le rapport Chlorophylle a / Chlorophylle b semble être relativement stable face à l'évolution du [CO_2] atmosphérique. Parmi les expériences déjà réalisées, soit le rapport ne varie pas de manière significative, comme pour le pin sylvestre (Jach & Ceulemans, 1997 ; Maroco *et al.*, 2002), soit augmente très légèrement sous fort [CO_2] comme pour l'épicéa, probablement du fait d'une modification de la proportion entre les deux photosystèmes (Kalina *et al.*, 1997). Eichelmann *et al.*, 2004 ; Zhang & Dang (2005) ont également constaté que le flux d'électrons transportés diminue mais reste suffisant pour maintenir une bonne efficience de la photosynthèse et de l'utilisation de l'eau.

III.7.2. Le métabolisme carboné primaire

III.7.2.1. Intégration du CO2 dans la matière organique

Le point d'entrée principal des molécules de CO_2 dans le cycle photosynthétique se fait dans le chloroplaste grâce à la Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) (Figure 8).

C'est l'enzyme majeure et essentielle de la photosynthèse. La protéine Rubisco est un hexadécamère constitué de 8 petites sous-unités (ssu, 12 à 18 kDa) codées par le génome nucléaire et 8 grandes sous-unités (lsu, 51 à 58 kDa) qui contiennent le site actif de l'enzyme (Gutteridge & Gatenby, 1995) codées par le génome chloroplastique (Webber *et al.*, 1994). La Rubisco contiendrait 16.67% d'azote (Evans, 1989 ; Tissue *et al.*, 1993 ; Warren *et al.*, 2003).

Elle présente deux fonctions antagonistes à la base des métabolismes carboné et azoté primaires : la fonction carboxylase de l'enzyme permet la première étape de fixation du **[CO_2]** atmosphérique lors de la phase lumineuse du cycle de Calvin (voir Figure 8), et sa fonction oxygénase est le point d'entrée du phénomène de photorespiration. Le facteur de spécificité S détermine le rapport entre ces deux fonctions, et atteint la valeur de 103.8 chez le chêne

pédonculé, pour des valeurs assez similaires chez les autres plantes en C3 (Balaguer *et al.*, 1996). 26 à 38% de l'azote foliaire serait contenu dans le pool de Rubisco (Warren *et al.*, 2003), et celui-ci représenterait 25 à 60 % du pool protéique chez les plantes en C3 (Webber *et al.*, 1994). Cette grande quantité de Rubisco pourrait contrebalancer le fait que celle-ci possède une faible affinité (et donc une faible activité catalytique) pour le CO_2 (Bainbridge *et al.*, 1995 ; Esquivel *et al.*, 2000), et pourrait servir de réserve d'azote remobilisable (Eichelmann & Laisk,1999 ; Warren *et al.*, 2003).

Dans la plupart des expériences, il est observé une diminution de la quantité et de l'activité de la Rubisco sous fortes concentrations en CO_2 atmosphérique malgré une augmentation de l'assimilation carbonée notable (Tissue *et al.*, 1993 ; Moore *et al.*, 1998, 1999; Vu *et al.*, 1998 ; Stitt & Krapp, 1999 ; Saxe *et al.*, 1998; Rogers & Ellsworth, 2002; Juurola, 2003; Eichelmann *et al.*, 2004 ; Ainsworth & Long, 2005). La diminution de la quantité de Rubisco expliquerait en grande partie la diminution de quantité totale de protéines solubles observée dans les feuilles (Fangmeier & Jäger, 1998 ; Stitt & Krapp, 1999). Le niveau d'activation de l'enzyme est parfois également réduit sous fort [CO_2] (Bowes, 1996; Sicher & Kremer, 1996; Li *et al.*, 2002; Luomala *et al.*, 2003), et serait une première étape vers l'optimisation de l'utilisation de l'azote, avant la diminution de la quantité même de l'enzyme.

Deux raisons majeures peuvent justifier cette diminution de l'investissement de la feuille dans la Rubisco : 1. Permettre l'équilibre entre les relations source-puits et éviter l'engorgement des cellules par les sucres (Bowes, 1996). Cette diminution de la quantité de Rubisco serait entre autres liée à une moindre production de l'enzyme, via une régulation négative des carbohydrates en concentration croissante dans les feuilles sur la transcription des gènes codant pour la Rubisco (Van Oosten *et al.*, 1994; Webber *et al.*, 1994 ; Nie *et al.*, 1995; Bowes, 1996 ; Cheng *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998,1999; Rogers & Ellsworth, 2002). 2. Réorienter l'azote vers d'autres processus plus limitants, entraînant ainsi une augmentation de l'efficience d'utilisation de l'azote dans les feuilles (Tissue *et al.*, 1993 ; Makino *et al.*, 1997; Saxe *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999). Webber *et al.* (1994) et Gifford *et al.* (2000) relient ce phénomène entre autres à la réduction nette du processus de photorespiration sous fort [CO_2] qui fait que l'investissement de la plante dans la production de Rubisco peut diminuer pour un même taux de photosynthèse final. La teneur en Rubisco n'est cependant pas toujours modifiée sous fort [CO_2], et l'étude de Sage *et al.* (1989) portée sur plusieurs espèces végétales n'a par exemple pas montré systématiquement de baisse de la concentration en Rubisco dans les feuilles.

La disponibilité en substrat pour la Rubisco (RuBP) et en phosphate inorganique (Pi), qui deviennent limitants lorsque le [CO_2] atmosphérique est élevé (Tissue *et al.*, 1993; Webber *et*

al., 1994), ne semble pas être réduite sous fort [CO_2] (Eichelmann *et al.*, 2004), ou alors beaucoup moins que la Rubisco elle-même (Ainsworth & Long, 2005).

Une autre enzyme permet l'incorporation d'une molécule de CO_2 dans la matière organique, dans le cytosol des cellules, la PEPc (Phosphoenolpyruvate carboxylase). Cette enzyme est impliquée dans la voie anaplérotique de fixation du carbone chez les C3, et présente de nombreuses fonctions décrites par Latzko & Kelly (1983). Elle permet entre autres : l'alimentation du cycle tricarboxylique en intermédiaires et l'assimilation azotée qui en découle, la production de NADPH, la reprise du CO_2 respiré, la l'évacuation des excès d'énergie par voir respiratoire résistante au cyanure, la « fermentation » du malate, le maintien du pH et de l'électroneutralité dans le cytosol, la réponse à la qualité de la lumière et la sensibilité aux températures.

L'effet d'un fort [CO_2] sur la PEPc semble plutôt négatif en fonction des expériences, puisque son activité peut être soit réduite comme chez l'épicéa (Van Oosten *et al.*, 1992) soit inchangée (Besford & Hand, 1989 ; Yelle *et al.*, 1989 ; Ferrario-Méry *et al.*, 1997).

III.7.2.2. Production et devenir des photosynthétats

Dans le cycle photosynthétique, les carbohydrates produits s'accumulent transitoirement pendant la journée dans les feuilles, et sont acheminés la nuit vers les organes - puits (en particulier feuilles en développement et racines) en fonction des capacités de ces derniers.

La production de carbohydrates est généralement stimulée sous fort [CO_2] (Moore *et al.*, 1999), pouvant monter jusqu'à +67% (Tjoelker *et al.*, 1998b) voire à plus de 130% chez certaines espèces (Poorter *et al.*, 1997). L'augmentation de la quantité de composés carbonés présents dans les feuilles sous [CO_2] élevé est plus particulièrement liée aux carbohydrates non-structuraux (TNC *Total Non-structural Carbohydrates*), principalement grâce à l'amidon, et dans une moindre mesure les sucres solubles (Pettersson & McDonald, 1992 ; Webber *et al.*, 1994; Ferrario-Méry *et al.*, 1997 ; Poorter *et al.*, 1997 ; Ceulemans *et al.*, 1998 ; Saxe *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999 ; Ainsworth & Long, 2005), le rapport entre les deux variant en fonction des espèces (Wullschleger *et al.*, 1992 ; Moore *et al.*, 1998 ; Tognetti *et al.*, 1998).

Les TNC et en particulier les hexoses ont un rôle important dans la régulation - transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle- de l'expression des gènes liés à la physiologie du carbone (Webber *et al.*, 1994 ; Smeekens & Rook, 1997), et en particulier des gènes chloroplastiques (Stitt, 1991; Van Oosten *et al.*, 1994). Leur accumulation entraînerait ainsi une diminution de la quantité de protéines impliquées dans la photosynthèse, dont la Rubisco (Webber *et al.*, 1994 ; Liozon *et al.*,

2000), l'inverse de l'amidon qui ne semble induire aucune modification (Ludewig *et al.*, 1998). Ces composés peuvent également avoir un effet négatif sur leur propre production, toujours afin de limiter au moins partiellement les excès de sucres dans les feuilles (Smeekens & Rook, 1997).

Le fait d'avoir une augmentation et une accumulation de sucres dans les feuilles sous [CO_2] élevé peut enfin induire parfois une augmentation de production des composés carbonés secondaires, comme la lignine, les tannins, polyphénols ou terpènes dans les feuilles comme observé chez deux espèces de chênes soumis à un fort [CO_2] (Tognetti *et al.*, 1998), mais pas chez les pins (Gebauer *et al.*, 1998 ; Sallas *et al.*, 2003).

III.7.2.3. Perte de carbone par photorespiration

Rares sont les expériences qui ont été menées sur l'effet du [CO_2] élevé sur les enzymes de la photorespiration. Dans le même sens que la diminution de la photorespiration globale, l'activité des enzymes photorespiratoires dont l'HPR et la GO a une légère tendance à diminuer sous fort [CO_2] (Van Oosten *et al.*, 1992; Van Oosten & Besford, 1994; Webber *et al.*, 1994; Booker *et al.*, 1997; Fangmeier & Jäger, 1998; Moore *et al.*, 1999). Ceci aurait en particulier comme conséquence de réduire en faible proportion la production de pouvoir réducteur fournit en particulier par la glycine décarboxylase (GDC) – enzyme majeure du cycle photorespiratoire. La faible diminution des quantités d'enzymes photorespiratoires tendrait à indiquer une conservation de l'azote dans les enzymes photorespiratoires, malgré la diminution de la photorespiration au niveau de la feuille entière en comparaison à la Rubisco (Bowes, 1991; Webber *et al.*, 1994; Booker *et al.*, 1997).

III.7.3. Le métabolisme azoté primaire dans les feuilles

Une partie de l'azote intégré dans métabolisme azoté foliaire provient de la transformation de l'azote minéral absorbé par les racines (essentiellement sous forme de nitrates) en azote ammoniacal (Figure 8), une autre partie provient du catabolisme protéique (recyclage lié à l'entretien des cellules ou à la sénescence des feuilles âgées) ou de l'utilisation des formes de transport de l'azote (circulant dans la sève : arginine, asparagine, uréides), mais la dernière et plus grosse fraction du pool d'ammonium utilisé provient du processus de photorespiration via la décarboxylation de la glycine (Ogren & Chollet, 1982 ; Blackwell *et al.*, 1990 ; Douce & Neuburger, 1999). Douce & Neuburger (1999) considèrent que le recyclage de l'azote

photorespiratoire est particulièrement efficace grâce à l'isoforme chloroplastique de la GS (Larios *et al.*, 2004) - la GS1 étant plutôt dédiée à la synthèse de glutamine pour le transport-, et prédominant sur les voies traditionnelles de réduction des nitrates par Nitrate Réductase et Nitrite réductase, beaucoup plus coûteuses en énergie et moins performantes (Jupin & Lamant, 1997).

Les pools de glutamine, d'asparagine ou d'arginine issus du métabolisme azoté sont des formes importantes de stockage et de transport de l'azote. Ces éléments peuvent soit être exportés, soit être utilisés pour la synthèse protéique (Miflin & Lea, 1980). La Glutamine intervient particulièrement dans 4 voies métaboliques, menant soit à l'élaboration de formes de stockage de l'azote (asparagine, arginine, uréides…), soit à l'élaboration de composés azotés « stables » utilisés pour la synthèse des protéines ou de l'ADN (acides aminés, purines et pyrimidines…). Glutamate et glutamine sont le plus souvent dégradés afin de produire les différents acides aminés. Pour cela, la glutamine synthétase (GS) est une enzyme majeure dans l'assimilation de l'azote (Lea & Miflin, 1974), d'autant plus qu'elle se retrouve de plus directement à la jonction entre métabolisme carboné et azoté, principalement grâce au processus de photorespiration. Elle présente deux isoformes, une cytosolique (GS1) et une localisée dans les chloropastes et les mitochondries (GS2) (Brugière *et al.*, 1997 ; Taira *et al.*, 2004), la forme GS2 étant généralement dominante (Hirel *et al.*, 1992).

Lors d'une augmentation du [CO_2] atmosphérique, l'activité et la quantité des enzymes impliquées dans le métabolisme azoté aurait tendance à diminuer, après une stimulation transitoire, comme pour la nitrate réductase, mais pas pour la glutamine synthétase (Bertoni & Becker, 1996 ; Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Schmadel-Hagebölling *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999). L'inhibition de l'activité de la GS observée dans certains cas devrait rendre la réassimilation de l'azote photorespiratoire presque nulle, compte-tenu de son importance par rapport à la photorespiration. Toutefois, les travaux de Blackwell *et al.* (1987) et Migge & Becker (2000) montrent que l'accumulation d'ions ammonium reste modérée si la GS ne descend pas en dessous d'un seuil de 40% de son activité optimale. En deçà de ce seuil, l'accumulation d'ions peut devenir toxique pour la plante et peut provoquer de graves nécroses foliaires.

IV. REGULATION GENETIQUE DE LA PHYSIOLOGIE

La génétique quantitative et la génétique fonctionnelle sont des disciplines complémentaires à l'étude de la physiologie et de la biochimie chez les végétaux, en allant cibler le rôle même du génome dans l'expression et la régulation des grands paramètres physiologiques.

IV.1. PRINCIPE DE LA DETECTION DE QTLs

On estime généralement qu'un grand nombre de caractères ou processus physiologiques sont déterminés par un ensemble de gènes plutôt qu'un seul. Le modèle polygénique considère en effet que le phénotype observé résulte de l'action d'un très grand nombre de gènes (tendant vers l'infini) dont les effets individuels faibles s'additionnent, et auxquels s'ajoute un effet du milieu (Plomion *et al.*, 1995 ; LeRoy & Elsen, 2000), ce qui rend le type de réponse difficilement prévisible (Ribaut & Hoisington, 1998). Jusqu'à présent, plusieurs auteurs considéraient que seul un petit nombre de gènes à effet majeur interviendraient pour une part significative dans l'expression de ces caractères (Paterson *et al.*, 1988 ; Edwards *et al.*, 1992 ; Goldman *et al.*, 1993), et un nombre important de gènes mineurs déterminerait alors le reste de la variation de l'expression (Prioul *et al.*, 1997). Cependant, on peut se demander si cela n'est pas une conséquence d'analyses sur un nombre trop souvent réduits de génotypes et de répétitions de ceux-ci .

Le polymorphisme des phénotypes observés reflète ainsi le polymorphisme de l'ensemble de ces gènes ou groupes de gènes de même que l'influence de l'environnement qui, chez les arbres forestiers, intervient assez nettement sur les différentes caractéristiques de l'arbre (Plomion *et al.*, 1996). Ce dernier point donne à ces caractères une faible héritabilité et rend la recherche des gènes impliqués d'autant plus délicate. Le but est de trouver un lien entre le polymorphisme observé à un locus (si possible correspondant à un gène connu) et la variation quantitative d'un trait donné (voir ANNEXE 3).

La détection de **QTLs** (***Q**uantitative **T**rait **L**oci*), qui sont les sites du génome d'un individu impliqués dans l'expression quantitative d'un caractère donné (un QTL correspondrait à un gène impliqué soit dans la régulation de l'expression d'autres gènes, soit directement dans l'expression d'un caractère) est basée sur ce polymorphisme. Une première information fournie

par la détection de QTLs est une meilleure connaissance de la variabilité génétique qui existe au sein d'une population, ainsi qu'une meilleure connaissance du génome des plantes et des évolutions de celui-ci entre les espèces. La recherche de QTLs aux différents stades de la vie d'un individu et sous différentes contraintes environnementales peut permettre également de prédire l'évolution d'un caractère donné à un moment et en un lieu donnés, ainsi que de connaître les potentialités génétiques d'un individu pour un trait quantitatif, indépendamment des conditions environnementales. Enfin, une dernière information apportée par ces analyses est liée au fait que les processus physiologiques élémentaires sont très souvent fortement intercorrélés et régulés par des systèmes complexes qui s'entrecroisent (Prioul *et al.,* 1997). La détection de QTLs qui co-localisent ou non peut alors nous renseigner sur ces interconnexions entre processus physiologiques.

IV.2. RECHERCHE DE QTLs ASSOCIES AUX PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES

Prioul *et al.* (1997) et de Vienne *et al.* (2001) signalent que le choix des éléments à mesurer doit préférentiellement se faire sur des points-clés du métabolisme, afin de pouvoir accéder au maximum de connaissance sur les phénomènes de régulation de ces facteurs. Cependant, l'ensemble des phénomènes de régulation du métabolisme végétal est loin d'être entièrement connu, et l'interprétation des QTLs détectés, de leurs colocalisations ou le déterminisme de possibles gènes candidats est bien souvent très difficile (McMullen *et al.*, 1998).

La première recherche de QTLs liés à la physiologie a été réalisée par Paterson *et al.* (1988), sur la croissance du fruit de la Tomate. Une recherche des QTLs associés à la discrimination isotopique a été réalisée sur cette même espèce l'année suivante (Martin *et al.*, 1989). D'autres études ont suivi, portant sur la composition en amidon des grains de maïs (Goldman, Rocheford & Dudley, 1993 ; Prioul *et al.,* 1999 ; Sené *et al.*, 2000), leur résistance aux insectes (McMullen *et al.*, 1998) ou à la sécheresse.

Prioul *et al.* (1997) ont rassemblé les connaissances de plusieurs études pour parvenir à trois conclusions majeures :

- Un caractère complexe peut être décomposé en plusieurs éléments distincts qui l'augmentent ou le réduisent
- Un petit nombre de facteurs mendéliens peut expliquer une part importante de la variation génétique d'un caractère (avec toutefois le problème posé par l'effectif de la population étudiée sur le nombre de QTLs détectés)
- Des caractères impliqués dans un même processus physiologique mais à des niveaux différents possèdent souvent les mêmes QTLs

Pour ce dernier point, les études de Causse *et al.* (1995) sur le maïs montrent deux résultats intéressants : le premier montre qu'il y a par contre peu de co-localisation entre les QTLs des gènes structuraux et ceux des enzymes associées. Le deuxième point est que, au niveau biochimique, les QTLs obtenus pour les enzymes co-localisent avec les QTLs détectés pour leurs substrats ou produits. Obara *et al.* (2001) ont par exemple détecté sur le riz des QTLs pour la GS1 (glutamine synthétase) ou la GOGAT dans les mêmes zones génétiques qui semblent être impliquées dans le recyclage de l'azote et les protéines solubles, de même que pour Gallais et Hirel (2004) qui observent des colocalisations entre les QTLs détectés pour les enzymes du métabolisme azoté dont la GS et l'efficience d'utilisation de l'azote. Hervé et al (2001) ont aussi trouvé une colocalisation sur le tournesol entre des QTLs codant pour l'ouverture des stomates et le potentiel hydrique des feuilles. Ce rapport peut également être montré entre différentes enzymes impliquées dans le même processus biochimique ou ayant un même substrat (comme la Sucrose synthase et l'Invertase qui ont pour substrat le saccharose), le ou les QTLs étant déterminés par un élément commun de régulation.

Prioul *et al.* (1997) soulignent que plus le nombre de QTL communs à deux processus physiologiques augmente, plus la probabilité d'existence d'un lien physiologique entre les deux processus est importante. De plus, si les QTLs communs peuvent expliquer les phénomènes d'additivité et de dominance des traits, cette probabilité est encore améliorée.

Cependant, il se peut que la corrélation entre deux traits participant à un même processus physiologique ne soir due qu'à la seule proximité des loci sur le génome, ce qui ramène au problème de distance minimale entre deux marqueurs lors de l'établissement de la carte génétique (Lebreton *et al.*, 1995). Des éléments « externes », liés aux conditions expérimentales, peuvent également perturber l'étude des QTLs. Sené *et al.* (2000) ont montré par exemple que les QTLs obtenus sur les mêmes lignées d'individus peuvent varier d'une année sur l'autre, probablement à cause du type de croisement effectué – autopollinisation / allopollinisation – et / ou à cause des relations entre QTLs et environnement.

Les QTLs obtenus pour certains points supposés liés du métabolisme peuvent par contre ne pas révéler de lien au niveau génétique. Par exemple, Saranga *et al.* (2001) ont trouvé des QTLs déterminant la discrimination isotopique et la production de biomasse, mais sans corrélation entre les deux, sur le coton. Les auteurs soulignent alors la difficulté de détecter les QTLs liés à des caractères multigéniques ou liés à des réponses physiologiques complexes comme la discrimination. On pourrait ainsi s'attendre à ce que la détermination de QTLs liés à la photosynthèse – déterminée en particulier de façon additive par l'apport de CO_2, la Rubisco et les chlorophylles (Simon, 1994) – soit très difficile à obtenir. Pourtant, Hervé *et al.* (2001) ont

réussi à détecter deux QTLs majeurs pour la photosynthèse nette. La variabilité génotypique de la photosynthèse a également été corrélée à l'expression de la Rubisco dans les feuilles de riz par Gesch *et al.* (2003). Dans ce sens, les études réalisées sur les plantes cultivées ont montré que le rendement agronomique, caractère dont la régulation pourrait paraître complexe, est souvent associé à un petit nombre de QTLs forts.

IV.3. LES INTERACTIONS AVEC L'ENVIRONNEMENT

De nombreuses études ont eu lieu sur les herbacées pour déterminer l'interaction entre QTLs et environnement, même si cette interaction est difficile à mettre en évidence (Jansen et al., 1995). La majeur partie des études à porté sur la salinité (ex. Koyama et al., 2001), le stress hydrique (ex. Saranga et al., 2001 ; Teulat et al., 1997, 2002 ; Price et al., 2002 ; Reymond et al., 2004 ; Saranga et al., 2004) ou la température (ex. Fracheboud et al., 2002, Hund et al., 2004 ; voir Tsarouhas et al., 2004 pour des exemples).

Dans le cas des interactions avec l'environnement, certains QTLs sont spécifiquement révélés par un stress, et d'autres sont parfaitement stables malgré les variations environnementales. Ceci peut indiquer une régulation génétique précise et forte, comme pour le développement racinaire du maïs (Hund *et al.*, 2004) ou la discrimination isotopique dans les herbacées (Hall *et al.*, 1994). Il peut également arriver qu'une zone génomique soit impliquée dans la réponse à un changement environnemental. Ainsi, Fracheboud *et al.* (2002) ont trouvé pour la tolérance au froid de la formation de chloroplastes fonctionnels chez le maïs, avec une colocalisation des QTLs liés à l'assimilation carbonée, la conductance stomatique, aux concentrations des différents pigments, et à l'efficience et au rendement quantique du PS II.

Enfin, quand la variable environnementale est directement impliquée dans les caractères mesurés, comme la disponibilité en azote par rapport au métabolisme azoté (Gallais & Hirel, 2004), il est possible de voir plus clairement un effet de l'environnement sur la régulation génétique, sans doute du fait du lien direct entre les différents facteurs. Gallais & Hirel (2004) ont détecté par exemple plus de QTLs lors d'un apport suffisant en azote que lors d'une carence azotée sur le développement végétatif du maïs et la production de grain, et moins de QTLs pour l'efficience d'utilisation de l'azote et la quantité d'azote dans les grains.

IV.4. LA SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS (SAM)

Après avoir pris connaissance des loci impliqués dans l'expression quantitative de certains caractères dans des situations environnementales données, il est possible, en utilisant les marqueurs liés à ces QTLs, de sélectionner les individus qui possèdent les caractères intéressants qui ne se manifesteront qu'à l'état adulte (**Wu *et al.*, 2000**).

Cette sélection repose sur la condition qu'un QTL intéressant est localisé de façon très proche d'un marqueur neutre (i.e. qui ne joue pas de rôle dans la physiologie de la plante, et donc qui n'est pas soumis à une quelconque régulation). La SAM consiste simplement à sélectionner les plantes pour ce marqueur, ce qui implique de fait une sélection du QTL lié.

Cependant, ce type de sélection basé sur la connaissance des QTLs est limité par plusieurs facteurs (Sene *et al.*, 2000) : le nombre de QTLs détectés, l'importance du déséquilibre de liaison entre les QTLs et les marqueurs, la stabilité de la liaison entre les QTLs et les marqueurs au cours du temps, et enfin l'estimation des effets de chacun des QTLs, qui a pu être biaisée.

IV.5. DETECTION DE QTLs CHEZ LES LIGNEUX

La plupart des QTL recherchés jusqu'à présent sur les arbres détermine un caractère économique (productivité, résistance à la sécheresse ou à une attaque biotique). Toutefois, des recherches plus fondamentales sont lancées depuis une dizaine d'années sur la physiologie des arbres (comportement du métabolisme d'un individu dans une situation donnée), de la même façon que pour les herbacées qui ont un historique plus développé sur cet aspect.

Le problème qui se pose généralement pour les ligneux est que les techniques de détection des QTLs ne sont pas forcément aisées à mettre en œuvre, du fait de plusieurs contraintes spécifiques aux arbres :

- L'étude d'un caractère est généralement réalisée sur un arbre adulte, le caractère observé chez le jeune ne correspondant pas forcément à celui qui sera noté chez l'adulte (Plomion *et al.*, 1996). Une attente minimum de 10 ou 20 ans (cycle de vie long) est donc nécessaire avant de réaliser les premières observations.

- Les études concernant un type de caractère doivent être réalisées sur un très grand nombre d'individus (Beavis, 1994; Van Buitjenen, 2001), et donc reste problématique chez les ligneux qui sont de grande taille (difficultés d'installation et de réalisation d'expériences sur un long terme) et avec un temps de génération très long.
- L'étude de l'héritabilité d'un caractère se fait sur plusieurs générations, ce qui rallonge d'autant le temps d'étude chez les ligneux, ceux-ci étant mâtures sexuellement très tardivement, plusieurs années au minimum. De plus, leurs cycles de reproduction sont peu fréquents (parfois espacés de plusieurs années) et le nombre de descendants arrivant à maturité est relativement réduit. Cette héritabilité reste enfin faible chez les arbres à cause de la pression environnementale très forte sur l'expression des gènes.
- Les caractères étudiés sont souvent polygéniques et ont donc une réponse complexe.

Malgré tout, des études ont été menées sur plusieurs essences d'arbres (liste non-exhaustive) :

- sur les arbres à feuilles persistantes, en particulier les pins et épicéa : Flanagan *et al.* (1995) ; Plomion *et al.* (1996) ; Hurme *et al.* (2000) ; Lerceteau *et al.* (2001); Brendel *et al.* (2002); Li & Yeh (2002); Weng *et al.* (2002); Brown *et al.* (2003); Jermstad *et al.* (2003); Devey *et al.* (2004).
- sur les arbres à feuilles caduques: sur les eucalyptus et diverses espèces de peupliers (Bradshaw & Grattapaglia, 1994; Bradshaw & Stettler, 1995; Thamarus *et al.*, 2004; Tagu *et al.*, 2005), le mélèze (Arcade *et al.*, 2002), le saule (Tsahouras *et al.*, 2004), le bouleau (Scalfi *et al.*, 2004a), l'hévéa (Lespinasse *et al.*, 2000); le pommier (Conner *et al.*, 1998), le cacaoyer (Crouzillat *et al.*, 2000; Flament *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005), le citronnier (Garcia *et al.*, 2000; Bernet *et al.*, 2005), le châtaigner (Casasoli *et al.*, 2004) et les chênes pédonculés et sessiles (Saintagne *et al.*, 2004; Scotti-Saintagne *et al.*, 2004, 2005).

De façon majoritaire, ces études se portent sur des critères économiques ou phytosanitaires comme la formation et la qualité du bois (Groover *et al.*, 1994 ; Arcade *et al.*, 2002 ; Sewell *et al.*, 2002 ; Brown *et al.*, 2003 ; Devey *et al.*, 2004 ; Thamarus et al, 2004), la résistance à des attaques biotiques (Lespinasse *et al.*, 2000 ; Flament *et al.*, 2001 ; Li & Yeh, 2002 ; Bernet *et al.*, 2005 ; Brown *et al.*, 2005) ou le rendement de production (Crouzillat *et al.*, 2000). Plus récemment, les études se sont portées sur la date de débourrement ou la croissance (Plomion *et al.*, 1996 ; Hurme *et al.*, 2000 ; Lerceteau *et al.*, 2001 ; Weng *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2003 ; Jermstad *et al.*, 2003 ; Casasoli *et al.*, 2004 ; Scotti-Saintagne *et al.*, 2004).

D'autres points d'étude se multiplient également, comme la différenciation entre espèces (Bradshaw & Grattapaglia, 1994 ; Saintagne *et al.*, 2004), la formation des mycorhizes (Tagu *et al.*, 2005), la discrimination isotopique ou l'efficience d'utilisation de l'eau (Flanagan & Johnsen, 1995 ; Brendel *et al.*, 2002 ; Casasoli *et al.*, 2004 ; Scalfi *et al.*, 2004a), la croissance foliaire (Scalfi *et al.*, 2004a) ou certains points spécifiques du métabolisme comme les teneurs en protéines (Costa & Plomion, 1999).

Enfin, quelques expériences se développent également sur l'adaptation des arbres à des variations climatiques et environnementales, en particulier le froid (Hurme *et al.*, 2000 ; Jermstad *et al.*, 2003 ; Tsahouras *et al.*, 2004) ou la disponibilité en eau du milieu (Jermstad *et al.*, 2003 ; Casasoli *et al.*, 2004). Les premières expériences sur l'effet d'un fort [CO_2] sur la détermination de QTLs commencent à peine à être publiées ces dernières années (Ferris *et al.*, 2002 ; Torti *et al.*, en cours). L'étude de Ferris *et al.* (2002) porte sur l'effet du [CO_2] sur la densité stomatique et le développement de l'épiderme (nombre de cellules et surface) chez le peuplier. Elle montre un déterminisme génétique de ces différents points, et révèle la stabilité d'un QTL codant pour la densité stomatique malgré une modification du [CO_2] atmosphérique. Casasoli *et al.* (2004) ont aussi révélé l'existence de QTLs stables, principalement liés à la phénologie du châtaigner, et 15 ans de mesures du rendement de production du cacaoyer ont montré l'existence de deux QTLs majeurs stables pour ce caractère. Ces derniers expliquent à eux seuls 20% de la variance du rendement et impliqués dans la régulation d'autres caractères comme la croissance en diamètre des plants.

Des colocalisations de QTLs codant pour la discrimination et la croissance ont été trouvées sur plusieurs groupes de liaison de la carte génétique du châtaigner (Casasoli *et al.*, 2004), avec dans la plupart des cas des effets opposés, ce qui correspond bien à ce que l'on peut attendre compte-tenu des relations physiologiques entre les deux paramètres. Une stabilité dans le temps des QTLs a également été trouvée pour des QTLs codant pour la discrimination isotopique chez le pin maritime par Flanagan *et al.* (1995).

La quantité et la localisation des QTLs trouvés peut varier entre les expériences et entre les espèces étudiées. Par exemple, Scotti-Saintagne *et al.* (2004) font une courte revue des expériences menées sur le débourrement de plusieurs essences d'arbres. Ils soulignent le fait que la régulation d'un paramètre comme le débourrement peut être soumis à des QTLs majeurs dans certaines espèces (pin sylvestre et peuplier), alors qu'il sera soumis à des QTLs faibles chez le sapin douglas. Il semblerait toutefois, sur l'ensemble des expériences menées jusqu'à

présent sur les capacités d'adaptation des arbres, que les caractères complexes soient plutôt déterminés par quelques loci ayant des effets importants (Sewell & Neale, 2000 ; Hurme *et al.*, 2000), avec l'intervention additionnelle de plusieurs QTLs de très faible effet (Casasoli *et al.*, 2004). La détermination des QTLs dépend également du stade de développement de l'arbre, comme pour la croissance (cf. Casasoli *et al.*, 2004).

Plus spécifiquement pour le chêne pédonculé, les populations naturelles peuvent montrer une forte hétérozygotie (Kremer & Petit, 1993 ; Zanetto *et al.*, 1994). Les cartes génétiques établies pour le chêne montrent une distance entre marqueurs inférieure à 20 cM (Barreneche *et al.*, 1998), ce qui est suffisant pour l'étude de QTL. Par conséquent, il est possible de détecter des QTL chez cette espèce à la condition que ceux-ci aient un effet majeur, et qu'un nombre suffisant d'individus soient testés. Scotti-Saintagne *et al.* (2004) trouvent des QTLs majeurs (<5% au niveau du génome) pour le débourrement et la croissance disséminés sur l'ensemble des cartes mâle et femelle du chêne pédonculé, avec un nombre plus élevé de QTLs localisés sur le premier tiers des chromosomes 10 mâle et femelle, que ce soit pour la hauteur des individus ou des caractéristiques de débourrement. L'étude des colocalisations a également révélé dans cette expérience une stabilité des QTLs trouvés sur deux sites différents pour des critères de développement mais pas pour la croissance en hauteur.

Chez les arbres, les recherches sur la Sélection Assistée par Marqueurs portent encore essentiellement sur des pins (ex. Ling *et al.*, 2000 ; Kumar & Garrick, 2001 ; Lerceteau *et al.*, 2001 ; plus développées au niveau génétique, et restent intéressantes pour d'autres espèces à intérêt économique comme le cacaoyer (Crouzillat *et al.*, 2000).

La recherche de gènes candidats est encore moins courante sur les arbres car elle nécessite une connaissance des gènes existants sur les cartes génétiques qui n'est pas forcément très avancée chez les arbres, mais tend à se développer (Frewen *et al.*, 2000 ; Neale *et al.*, 2002). Les dernières avancées en matière de recherche de gènes candidats sur les herbacées tendraient par contre à montrer que le gène lié à un QTL donné n'est pas forcément associé de manière directe au caractère étudié. Par exemple, Masle *et al.* (2005) ont associé à un QTL lié à la discrimination isotopique un gène (*ERECTA*) codant pour une kinase d'abord connue pour son rôle dans la formation des inflorescences d'*Arabidopsis*.

Malgré les difficultés que présente la recherche de QTLs chez les arbres, la technique mérite d'être développée, car les renseignements qu'elle apporte sont d'une nature différente et complémentaire aux simples analyses des phénotypes, en informant sur la diversité intra-famille de ces caractères phénotypiques et en offrant des opportunités pour mieux utiliser cette dernière.

PROBLEMATIQUE

PROBLEMATIQUE

Au regard des différentes études qui ont déjà porté sur les réponses des arbres au [CO_2] élevé, de nombreuses connaissances ont déjà été accumulées, mais il reste des zones d'ombre et plusieurs problèmes se posent :

- Il semble difficile de donner un comportement-type de l'arbre face à ce paramètre (Norby *et al.*, 1999), la variabilité des réponses entre grands types d'arbres (feuillus ou résineux), entre espèces, entre différents individus d'une même espèce voire au sein d'une même famille. A cette variabilité s'ajoute les modulations des réponses au [CO_2] en fonction d'autres paramètres internes, comme l'âge des individus ou la réponse saisonnière, ou externes comme les facteurs climatiques, nutritionnels ou les relations de l'arbre avec son biotope.

- Il y a un manque de vision d'ensemble sur le comportement global d'un individu face à l'élévation du [CO_2] dans beaucoup d'études, la plupart des expériences se concentrant généralement sur un ou deux points de la physiologie ou du métabolisme.

- La grande taille des arbres et la durée de leur cycle de vie font que les études sur les arbres adultes sont peu fréquentes, même si elles tendent à se développer avec les systèmes FACE. Il est pourtant particulièrement difficile d'extrapoler les résultats obtenus uniquement sur de jeunes arbres sur des individus adultes qui ont forcément une réponse modulée.

- Le retard pris dans les études génétiques sur les arbres, hormis celles impliquées dans le domaine économique comme pour les pins et qui sont déjà bien développées, est encore assez important par rapport aux études sur les herbacées. La longueur du cycle de vie des arbres est là aussi en cause, en plus des contraintes d'études plus importantes pour les arbres que pour les herbacées, par exemple du fait de leur plus forte teneur en lignine ou en tannins qui ne facilitent pas les protocoles d'étude. De plus, peu d'expériences ont été menées sur la variabilité intra-spécifique de la physiologie des arbres, et encore moins concernant la variabilité de sa réponse face à une contrainte environnementale.

A partir de ces constats, j'ai choisi de réaliser une seule expérience importante sur une famille de chênes pédonculés dont la carte génétique a été construite récemment, et qui est utilisée pour d'autres expériences de ce type dans d'autres conditions environnementales.

Deux directions d'étude principales ont été fixées pour cette étude:

- ⇨ Dans un premier temps, j'ai cherché à déterminer quelles étaient les réponses de l'arbre face à une élévation du [CO_2] atmosphérique. J'ai étudié ces réponses à différentes échelles, de l'individu entier au métabolisme primaire carbonée et azoté. Ceci devait permettre de réaliser une « photographie » à un moment donné de la réponse des arbres au fort [CO_2] aux différents niveaux et de comparer les résultats à ceux de la littérature. J'ai également effectué les mesures à différentes dates afin de dégager la cinétique de réponse des arbres au fort [CO_2].

- ⇨ Dans un deuxième temps, la somme des résultats obtenus a été utilisée pour déterminer la variabilité intra-spécifique dans l'expression de ces différents paramètres au sein de la famille étudiée. Ceci a été réalisé afin de répondre à différentes questions:

    1. quelle est la variabilité intra-spécifique « de base » entre les différents individus de la population ?

    2. quelle est la variabilité intra-spécifique de la réponse de ces individus à l'élévation du [CO_2] atmosphérique ?

    3. quelles sont les informations que nous donnent les corrélations entre les différentes régions génomiques impliquées dans les réponses des différents caractères sur la physiologie de l'arbre ? Révèlent-elles des corrélations au niveau des voies biochimiques ? Des éléments de régulation communs ?

A partir de ces différentes points d'étude, la présentation des résultats et la discussion vont s'articuler selon les deux questions majeures, et vont traiter des données physiques et physiologiques dans un premier temps, et des données génétiques dans un second temps.

MATERIEL & METHODES

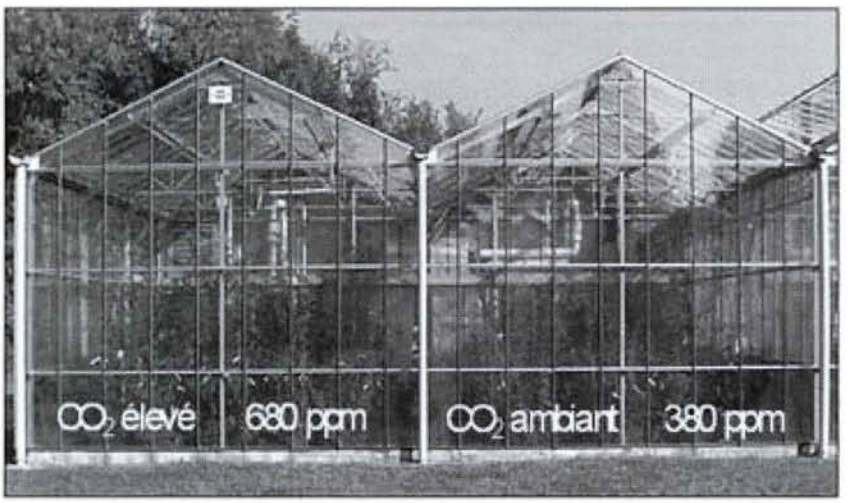


Figure 10 : Serres à CO_2 utilisées pour l'expérience

(INRA Champenoux; 48°45 ' N, 6°20 ' E, 259 m au dessus du niveau de la mer, France).

MATERIEL & METHODES

I. LE MATERIEL D'ETUDE

L'étude a porté sur des chênes pédonculés (*Quercus robur* L.) âgés de 3 ans, provenant des pépinières de la station de recherche INRA de Bordeaux, Pierroton.

Tous les arbres étaient issus d'un même croisement réalisé en 1992 entre un chêne - père originaire du bassin d'Arcachon et un chêne - mère originaire du centre INRA de Pierroton (Barreneche *et al.*, 1998). 275 génotypes ont ainsi été élevés en pépinière, et clonés par rejet de souche.

Au laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Arbres de Pierroton, une première carte génétique du chêne pédonculé (Barreneche *et al.*, 1998) a été réalisée à partir de ces arbres, essentiellement à partir de marqueurs neutres (RAPD, RFLP...).

183 génotypes ont été acheminés depuis Bordeaux pour cette étude, avec 2 copies pour 163 d'entre eux, et 4 pour les vingt derniers. Les arbres ont été rempotés fin hiver 2001 dans des pots de 10 litres, avec un mélange sable : tourbe (1 :1) additionné de NUTRICOT® 100 NPK ($5g.L^{-1}$) et de calcaire magnésien ($0.2\ g.L^{-1}$). Cette fertilisation a été renouvelée au début de l'été afin de maintenir les arbres dans des conditions optimales de nutrition. Un système d'irrigation automatique leur a fourni de l'eau deux fois par jour, jusqu'à ressuyage, et ce jusqu'à la fin de l'expérience.

Les arbres ont été placés dans deux serres du centre INRA de Nancy (figure 10), avec un clone par génotype dans chacune des serres, et une disposition identique. Les clones supplémentaires ont été rajoutés dans chaque serre, ce qui permet d'avoir dans chacune 10 génotypes à 3 copies.

Les conditions environnementales des serres ont été contrôlées en permanence, des mesures de température, éclairement, humidité et concentration en CO_2 étant réalisées toutes les demi-heures. La température à l'intérieure des serres était calquée sur la température extérieure. Toutefois, les serres étaient légèrement réchauffées en cas d'abaissement de la température en dessous de 10°C, ou rafraîchies dans les cas où la température dépasse les 40°C. La

		Temperature (°C)		Humidité relative (%)		PPFD		
Flush	**Date**	**Ambiant**	**CO_2 élevé**	**Ambiant**	**CO_2 élevé**	**Ambiant**	**CO_2 élevé**	**Mesures réalisées**
	12 mai (**t0**)	-	-	-	-	-	-	Diamètre & Hauteur du tronc
Flush 1	29 mai (**t1**)	26.2	22.3	73.1	62.7	912	914	Echanges gazeux
Flush 2	13 juin	21.4	21.3	71.9	68.1	1031	1046	Caractéristiques foliaires: teneur en eau, SLA, Pigments
	21 juin	25.7	25.4	61.9	62.0	1031	1046	Biochimie: Rubisco, PEPc, HPR, GO, GS, Saccharose
	26 juin (**t2**)	29.3	29.4	62.9	67.0	746	747	Echanges gazeux
	2 juillet	24.0	23.9	66.6	67.8	1116	1117	
Flush 3	24 juillet (**t3**)	26.9	27.2	65.9	60.4	970	972	Echanges gazeux
	22 août (**t4**)	23.9	23.9	59.9	61.6	820	880	Echanges gazeux
	28 septembre (**t5**)	18.5	17.2	54.6	56.1	639	668	Echanges gazeux, Diamètre & Hauteur du tronc, Biomasse Caractéristiques foliaires: teneur en eau, SLA, Pigments, Azote $\Delta^{13}C$ des feuilles et de la cellulose du bois Biochimie: Rubisco, PEPc, HPR, GO, GS, Saccharose

Tableau 1: Dates et détail des différentes mesures réalisées sur les chênes pédonculés, données climatiques des serres aux dates de mesure et durant la période de mesure dans la journée (9h - 13h).

Les mesures d 'échanges gazeux ont été réalisées à toutes les dates afin de pouvoir corréler les résultats à ceux obtenus sur les feuilles prélevées, mais pour la comparaison des échanges gazeux entre eux, la mesure du second flush correspond spécifiquement à la date du 26 juin (t2).

concentration en dioxyde de carbone était régulée par injection de CO_2 à partir d'un réservoir. Dans la première serre, dite « à CO_2 ambiant », la concentration en CO_2 était ainsi maintenue à une valeur moyenne de 380 vpm (± 40 vpm). Dans la seconde serre, « à CO_2 double », du dioxyde de carbone a été injecté en permanence pour maintenir une concentration moyenne de 680 vpm dans l'air (± 40 vpm).

Les arbres ont été initialement déplacés de 20 pots toutes les 2 semaines dès le développement foliaire, puis toutes les 3 semaines, de telle sorte qu'un arbre donné aura circulé dans toute la serre au cours de sa saison de végétation.

Un traitement phytosanitaire à base de soufre a été effectué pour limiter le développement d'oïdium dans les serres, relativement humides et propices au développement du champignon en été.

II. MESURES & PRELEVEMENTS EN SERRES

Les différentes mesures effectuées sur les arbres sont référencées dans le Tableau 1.

II.1. Mesures de croissance et de biomasse

Au temps t0 (avant débourrement, le 12 mai 2001) et t5 (à la fin de la saison de végétation, le 28 septembre 2001), la taille de la tige principale des arbres a été mesurée à partir du collet, ainsi que le diamètre au collet et la surface de la section.

A la fin de l'expérience (t5), les arbres ont été sacrifiés, fractionnés, séchés puis pesés en fonction de leurs composantes foliaire, caulinaire et racinaire.

Une partie des tiges ainsi récupérées a été utilisée pour les mesures de discrimination isotopique sur la cellulose du bois.

Figure 11: Emplacement des feuilles prélevées sur les tiges de chêne pédonculé lors de l'expérience. Les feuilles prélevées (indiquées par des flèches) sont en position 3, 4 et 5 à partir de l'apex du flush.

II. 2. Choix des feuilles étudiées

Deux tiges ont été sélectionnées pour chaque arbre. Les ramifications prises en compte étaient, par ordre décroissant d'importance : la pousse issue du bourgeon terminal - s'il n'avait pas avorté, une pousse latérale bien développée partant de la base de l'arbre (qui se comporte comme un axe principal), une pousse latérale localisée au sommet de l'arbre, ou une pousse latérale mineure. Dans tous les cas, les pousses devaient présenter un minimum de ramifications (donc avec une structure la plus proche possible d'un cas de dominance apicale), et un nombre de feuilles suffisant pour le prélèvement.

Trois feuilles ont été prélevées par tige, en position 3, 4 et 5 à partir du sommet du flush afin de ne pas avoir de phénomène d'ombrage qui risque de biaiser les résultats (Figure 11).

Ce nombre de feuilles a été fixé en fonction de la quantité de matériel nécessaire pour toutes les analyses, ainsi que de la nécessité de garder une partie des feuilles en place pour permettre à l'arbre de poursuivre sa croissance normalement.

II.3. Mesures d'échanges gazeux

Les mesures ont été effectuées simultanément sur l'ensemble des arbres des deux serres grâce à deux appareils LI-COR 6200 ®, les 29 mai, 26 juin, 24 juillet, 22 août, et 28 septembre 2001. Toutes ces mesures ont été réalisées dans le créneau horaire de 9 heures à 13 heures (midi solaire), dans des conditions d'éclairement maximal (jours de ciel dégagé sans nuages).

D'autres mesures ont été faites les 13 et 21 juin, et 2 juillet 2001, uniquement sur les arbres échantillonnés ces mêmes jours afin de pouvoir corréler les résultats de biochimie à ceux des échanges gazeux.

Ces mesures concernent le dernier flush pleinement développé :

- 29 mai : flush 1 (t1)
- 13, 21, 26 juin (t2), 2 juillet : flush 2
- 24 juillet (t3), 22 août (t4), 28 septembre (t5) : flush 3

Les mesures portent sur les feuilles supérieures des flushs, bien étalées et matures, qui reçoivent un éclairement optimal et sans lésion particulière. Les jours d'échantillonnage, ce sont les feuilles sélectionnées pour le prélèvement qui servent aux mesures d'échanges gazeux.

II.4. Organisation des prélèvements sur les arbres

Nous avons choisi de faire débuter les prélèvements à partir du second flush, car les réserves carbonées réalisées par les arbres l'année précédant l'expérience peuvent biaiser les résultats relatifs à un effet du CO_2 élevé. Nous prenons donc le postulat que l'effet de ces réserves est suffisamment faible lors de la mise en place du second flush pour ne pas le prendre en compte dans les résultats.

La période intéressante pour le premier prélèvement va ainsi de la fin de la mise en place du 2nd flush (caractérisé par l'arrêt de l'étalement de l'avant-dernière feuille) au développement du 3ème flush (gonflement puis débourrement du bourgeon) (voir ANNEXE 4). Cet intervalle de temps dure de 1 à 2 semaines selon les arbres. Un suivi individuel des arbres tous les 2 ou 3 jours est réalisé à partir du 18 mai (le 21 mai 2001 : 30 à 70 % des arbres ont déjà commencé la mise en place du second flush, selon les serres). Un délai de 1 mois s'est écoulé entre les débourrements des premiers arbres et ceux des derniers. 4 dates de prélèvement ont ainsi été fixées pour les feuilles du second flush, en prélevant le même jour les clones issus d'un même génotype : les 13, 21 et 26 juin, et le 2 juillet 2001.

La deuxième série de prélèvements est effectuée le 28 septembre 2001 sur le 3ème flush, tous les arbres n'ayant pas développé de 4ème pousse. Les conditions nécessaires pour réaliser les mesures d'échanges gazeux puis prélever les feuilles dans un intervalle de temps court (ensoleillement optimal durant plusieurs jours d'affilée) ne se sont présentées qu'à la fin de la période estivale.

II.5. Mesures des caractéristiques foliaires

Sitôt prélevées, les 6 feuilles sont pesées ensemble, puis passées au planimètre (caméra vidéo couplée à un analyseur d'image DeltaT, U.K.) pour mesurer la surface foliaire totale. Ceci nous permet d'avoir:

- La masse fraîche moyenne d'une feuille (en mg)
- La surface foliaire moyenne d'une feuille (en cm^2)

Les échantillons sont alors congelés dans de l'azote liquide, transportés dans de la carboglace, puis stockés au congélateur à –80°C. Deux moitiés de feuilles (coupées le long de la nervure centrale) sont prélevées sur chaque lot, correspondant aux feuilles en position 4 par rapport à l'apex des deux rameaux échantillonnés. Les moitiés de feuilles sont pesées et séchées durant 3 jours à 60°C.

Elles sont pesées à nouveau après séchage afin d'avoir une estimation de la masse sèche foliaire, et après calcul, de la SLA (Specific Leaf Area) qui donne la surface moyenne foliaire en cm^2 par gramme de poids sec.

Ces feuilles sont ensuite utilisées pour les mesures de discrimination isotopique.

III. ETUDE DE LA COMPOSITION ISOTOPIQUE EN ^{13}C DES ARBRES

III.1. Mesure du rapport isotopique de l'air

Les mesures de la discrimination de l'air ont été faites par le biais de plants de maïs. Des graines de maïs (hybride F292 x F252 ; INRA Lusignan) ont été mises à germer durant 3 jours sur du coton humide, puis rempotées dans un mélange de terre fertilisé (pour 10 litres de mélange 1/2 tourbe +1/2 sable, ajout de 50 g de Nutricot et 2g de calcaire magnésien). Une première plantation a été effectuée le 6 avril 2001, et une seconde le 2 juillet 2001.

Deux pots contenant chacun deux plants de maïs ont été placés dans chacune des serres. Le premier pot a été placé sur le côté de la serre, et le second en son centre.

Des prélèvements ont été effectués sur la 4ème feuille formée puis sur les feuilles supérieures, environ toutes les 3 semaines (20/06/01 ; 12/07/01 ; 06/08/01 ; 27/08/01 ; 01/10/01). A chaque fois, la moitié d'une feuille a été prélevée - côté pointe. Seuls les trois derniers prélèvements sur les maïs les plus jeunes ont été conservés pour l'estimation de la discrimination de l'air. Les feuilles ont été séchées à 60°C durant trois jour, puis réduites en fine poudre avant les analyses de discrimination.

Le calcul du δ air via la discrimination δ p mesurée sur les feuilles de maïs placées à proximité des plants se fait par la relation (Marino & Elroy, 1991 ; Picon *et al.*, 1996) :

$$\delta a = 3.276 + \delta p$$

Picon *et al.* (1996) précisent cependant que, dans leur expérience, une approximation de 0.5 ‰ sur les valeurs finales de discrimination est apportée par cette méthode de mesure du delta de l'air.

III.2. Mesure du rapport isotopique des feuilles de chêne

Les analyses ont été effectuées sur les feuilles prélevées au début de l'automne (t5) uniquement, à cause du très faible rapport $^{13}C/^{12}C$ dans les bonbonnes de CO_2 qui entraîne un biais dans les valeurs de discrimination mesurées en début de traitement (la bonbonne a été changée le 19/06/01). Les mesures de discrimination sur les feuilles permettent de faire une comparaison entre les échanges gazeux et l'assimilation du carbone dans les sucres durant la journée, qui peuvent représenter une fraction importante de la matière sèche.

Les 2 demi - feuilles prélevées pour effectuer les mesures de masse sèche sont broyées au broyeur à bille (Sodemi). 1 mg de poudre fine est encapsulée pour les mesures au spectromètre de masse (Delta S Isotope Ratio Mass Spectrometer, Finnigan Mat, Allemagne) au centre INRA de Nancy.

Le spectromètre de masse nous donne la composition relative isotopique $\delta^{13}C$ (en ‰) de l'échantillon par rapport au standard international, la PeeDeeBelemnite. A partir de cette valeur, on peut calculer la discrimination isotopique proprement dite de l'échantillon ($\Delta^{13}C$) selon la relation :

$$\Delta\ (‰) = (\delta\ air - \delta\ échantillon) / (1 + 10^3 * \delta\ échantillon)$$

III.3. Mesure du rapport isotopique de la cellulose

Pour pallier au problème posé par la valeur intégrative des mesures sur les feuilles, une analyse de la discrimination isotopique de la cellulose qui donne une valeur plus intégrative des échanges gazeux sur toute la saison de croissance (Brendel, 2001). En effet, la cellulose est une chaîne polysaccharidique composée de 95 à 98 % de molécules de glucose, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques de type bêta. La cellulose du bois est constituée à partir des molécules de glucose élaborées dans les feuilles, et joue un rôle structural majeur pour la plante

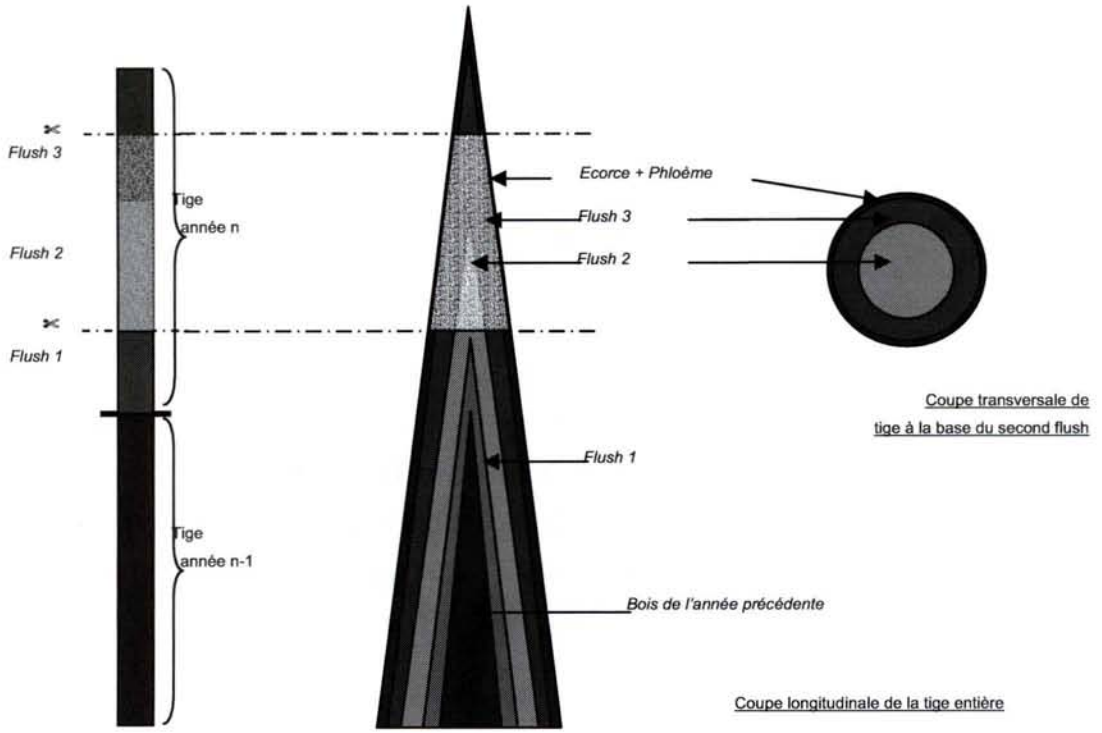


Figure 12: Schéma de coupe des tiges de Chêne effectuées en vue de l'extraction de cellulose.

(formation des parois végétales). L'intérêt de ce composé est sa relative stabilité dans l'espace et dans le temps : une fois les cernes de bois formés, leur composition en cellulose ne varie pratiquement plus. La discrimination isotopique mesurée sur le bois prend donc en compte l'origine des molécules de glucose formant la cellulose d'un cerne et l'accumulation seule dans le temps des différents cernes (sans remobilisation des composés glucidiques). L'autre intérêt de l'extraction de cellulose est d'éliminer l'effet du rapport entre lignine et cellulose qui entraîne des variations du signal isotopique du bois entier en fonction des proportions entre chaque composé.

Des portions de tige ont été coupées à la fin de la saison de végétation (02/10/01) sur chacun des individus (Figure 12). Ces portions débutent à la base du second flush formé durant l'expérience, et mesurent environ 12 cm de haut (les $2^{èmes}$ et $3^{èmes}$ flushs sont représentés). Si la longueur de tige n'est pas suffisante, une autre tige du même arbre est utilisée pour compléter.

Les tiges sont conservées au froid (-80 °C) jusqu'à utilisation. Elles sont alors écorcées (le travail étant facilité par la décongélation qui provoque le décollement de la partie vivante de la tige au niveau du cambium), et seul le bois – xylème - est conservé. Les tiges ainsi dénudées sont coupées en petits bouts, puis séchées durant une semaine à 60°C. Après séchage, elles sont réduites en poudre fine par broyage durant 2 minutes (broyeur à galet Sodemi, bols de 500 ml). Les poudres sont stockées dans des piluliers en plastique.

50 mg (± 10%) de poudre sèche sont pesés et introduits dans de petits sachets de Téflon (Alltech, ref. 2059) pour le processus d'extraction de la cellulose. En même temps sont introduites une ou plusieurs perles de couleur qui servent à la numérotation des échantillons.

L'extraction de la cellulose se déroule en plusieurs étapes (ANNEXE 5):

- Elimination des graisses et résines présentes dans le bois par des solvants
- Elimination des molécules hydrosolubles du bois par un passage dans l'eau bouillante.
- Elimination de la lignine par des bains successifs dans un mélange eau / $NaClO_2$ / acide acétique.

De la même façon que pour les poudres de feuilles, 1 mg de cellulose est pesé pour être analysé au spectromètre de masse.

IV. ANALYSES BIOCHIMIQUES

Le nombre de génotypes étudiés à été réduit à 100 pour ces analyses (excepté pour la quantification des pigments pour laquelle les 183 génotypes ont été étudiés) pour des raisons de coût du matériel et de temps d'analyse. Les 100 génotypes ont été choisis par hasard parmi les 183 génotypes de départ.

IV.1. Quantification de la Rubisco par électrophorèse capillaire

Cette technique est basée sur celle développée par Warren *et al.* (2000).

100 mg de Matière Fraîche sont broyés à froid avec 50 % (m/m) de **PVPP** dans un tube eppendorf de 2ml, durant 2 fois 35 secondes à la fréquence 1/s = 25 Hz avec deux billes de tungstène (Retsch, MM 301). La plaque dans laquelle les tubes sont disposés pour le broyage doit être maintenue en dessous de 0°C afin que la poudre ne décongèle pas (elle est au préalable refroidie à –80°C). Entre les deux broyages, les tubes doivent également être remis dans l'azote liquide. La poudre fine obtenue est reprise dans 1,5 ml d'un tampon de composition :

Tampon Tris-HCl (pH 8) : 50 mM ; **SDS** : 1 % (m/v) ; **Glycérol** : 15 % (v/v) ; **ß-mercaptoéthanol** : 0.1 M.

L'extrait est homogénéisé au broyeur 2 fois 45 secondes à 1/s = 20, puis centrifugé durant 5 minutes à 40 000 *g*, 4°C (Beckman Avanti 30 Centrifuge). Le volume de surnageant est mesuré, et 400 µl sont prélevés pour l'électrophorèse. 20 µl de référence interne (**Acide benzoïque** à 2 mg/ml) y sont ajoutés avant de dénaturer l'extrait dans un bain-marie à 100°C durant 10 minutes.

L'extrait est ensuite refroidi à l'air ambiant, puis centrifugé une nouvelle fois à 11 000 *g* pour éliminer les dernières impuretés.

La quantification de Rubisco par électrophorèse capillaire a été effectuée au laboratoire de chimie analytique de la faculté de Pharmacie de Nancy. Les mesures d'électrophorèse sont réalisées dans les 9 heures maximum suivant l'extraction, à raison de 14 échantillons maximum par séquence d'analyses.

Pour 10 extraits, 1 standard Rubisco à 1.5 mg/ml (ref. Sigma R-8000) est analysé en début de séquence. La Rubisco utilisée ici est reçue partiellement purifiée à partir de feuilles d'Epinard. Une analyse sur gel d'électrophorèse à permis de déterminer que la poudre contient 46.6 % de

Rubisco (lsu + ssu) effective. La préparation du standard pour les analyses prend en compte cette pureté.

Les profils des électrophorégrammes des extraits sont analysés et comparés à celui du standard Rubisco de la séquence. Le pic d'acide benzoïque permet de contrôler la dérive de la technique de mesure. La hauteur des deux pics de petite et grande sous-unités de la Rubisco est ensuite mesurée, et sert de référence pour les déterminations de concentration dans les extraits végétaux.

Cette technique présente une erreur standard de 9.3% (n=5) entre deux répétitions pour un même échantillon, ce qui correspond à l'erreur constatée sur les autres analyses biochimiques effectuées sur plusieurs prélèvements d'un même échantillon de feuille.

IV.2. Dosage des Protéines Totales

Le dosage est réalisé sur les extraits utilisés pour la quantification de la Rubisco, à la sortie de la centrifugeuse.

La technique de dosage comporte deux phases : la première consiste à rincer les extraits à l'acétone glacé afin d'éliminer le SDS et le ß-mercaptoéthanol qui interfèrent avec le réactif de dosage des protéines. La seconde phase est celle proposée dans le kit «DC Protein Assay Reagent Pack ®» de Biorad, et permet la quantification proprement dite des protéines même si elles ne sont pas complètement purifiées. La première phase de lavage des protéines proposée par ce kit n'a pas été retenue par rapport au rinçage à l'acétone, car elle ne permettait pas d'éliminer totalement les pigments présents dans les extraits, ce qui interférait avec les mesures finales d'absorbance.

1ère étape : lavage des extraits à l'acétone glacée

Les échantillons sont au préalable dilués 10 fois dans du tampon d'extraction décrit dans le paragraphe précédent. De l'acétone à 80 % est préparée à l'avance, puis conservée toute une nuit à –20°C avant utilisation.

25 µl d'extrait dilué sont alors mélangés à 300 µl d'acétone glacé dans un tube. Le mélange est homogénéisé avec un vortex durant 10 secondes, puis disposé à –20°C durant 2 heures minimum (un contact plus court ne permet pas de précipiter toutes les protéines). Les tubes sont ensuite centrifugés à 15 000 *g*, 0°C, durant 6 minutes. Le surnageant est enfin éliminé par une

aspiration méticuleuse à la trompe à vide (il est préférable de laisser un mince film d'acétone plutôt que de casser le culot formé).

Des essais ont montré que un seul rinçage était suffisant pour récupérer le maximum de protéines, avec un rendement moyen de conservation des protéines de 71,8 % (n =7). Un deuxième rinçage entraîne une perte supplémentaire de 10 % des protéines sans améliorer la qualité finale des mesures.

2ème étape : quantification des protéines

Le mélange A' proposé par le kit est préparé, et 127 µl en sont ajoutés au culot de protéines de chaque tube. L'ensemble est homogénéisé par deux agitations successives de 30 secondes à la fréquence de 1/s = 25 Hz sur le broyeur Retsch® MM301. Les tubes sont alors laissés à température ambiante durant 5 minutes.

1 ml du réactif DC B est alors ajouté, et le mélange est vortexé durant 10 secondes avant d'être mis à incuber à température ambiante durant 15 minutes exactement.

L'absorbance à 750 nm est alors mesurée contre un blanc sur le Spectrophotomètre Beckman DU® 640. Les données obtenues sont comparées à une gamme étalon à la Serumalbumine bovine (de 0 à 8.87µg / ml) dosée de la même façon.

IV.3. Extraction et dosage des protéines solubles

IV.3.1. Extraction

Tous les dosages suivants (protéines, activités enzymatiques) sont réalisés sur le même extrait.

60 mg de matière fraîche sont prélevés et broyés dans l'azote liquide. A la poudre est ajouté 50 % (m/m) de **PVPP**, et 3 ml de tampon d'extraction, dont la composition a été légèrement modifiée par rapport à celle de Citerne & Dizengremel (1986) et Dolisy (1999) :

Tampon HEPES-KOH (pH 7,5) : 100 mM; **PVP 25** : 6 % (m/m); **PEG 20** : 7 % (m/m); **DTT** : 2 mM; **MgCl2** : 5 mM; **EGTA** : 5 mM; **Glycérol** : 10 % (v/v); **Pepstatin** : 1 µM; **Leupeptin** : 1 µM.

Les extraits sont centrifugés durant 30 minutes à 30 000 *g*, 4°C (centrifugeuse Beckman Avanti 30 Centrifuge ; Rotor F-1010). Les surnageants sont temporairement stockés dans la glace.

IV.3.2. Filtration des extraits végétaux

Les extraits bruts sont dessalés par passage sur colonne Séphadex G25 (Amersham PD-10). 2,5 ml d'extrait sont ainsi filtrés, puis élués avec 3,5 ml de tampon d'élution de composition :

Tampon HEPES - KOH (pH 7.5) : 100 mM ; **DTT** : 2 mM ; **MgCl2** : 5 mM ; **Glycérol** : 10 % (v/v).

Les mesures de concentration en protéines solubles et d'activités enzymatiques sont réalisées à partir de cet éluat. Le dosage de la GS nécessite une analyse immédiate, alors que les éluats peuvent sans problème être conservés plusieurs mois à – 80°C avant dosage des autres enzymes.

IV.3.3. Quantification des Protéines Solubles

Le dosage est effectué sur les extraits enzymatiques dessalés, afin de pouvoir calculer les activités des différentes enzymes le plus rigoureusement possible.

- *Principe du dosage (Bradford, 1976) :*

Il est basé sur le déplacement d'absorption du bleu de Coomassie G250 dye (réactif de Biorad) de 465 à 595 nm lorsqu'il se complexe à une protéine.

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

- *Dosage par lecteur de microplaques:*

Le lecteur de microplaques permet d'automatiser les analyses de protéines et de conserver des conditions de mesures identiques pour le maximum d'échantillons.

Les analyses se font dans une plaque de 98 puits de 300 µl chacun.

Dans un puits de 300 µl, on réalise le mélange :

80 µl d'eau distillée

80 µl d'extrait protéique dilué 100 fois

40 µl de réactif Biorad®

La plaque est agitée durant 20 secondes afin d'homogénéiser le mélange, puis laissée à incuber 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre une gamme étalon de SerumAlbumine Bovine SAB (0 à 15 µg/ml).

2 répétitions sont effectuées pour chaque échantillon.

IV.4. Activités enzymatiques spécifiques

IV.4.1. Principe des mesures

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

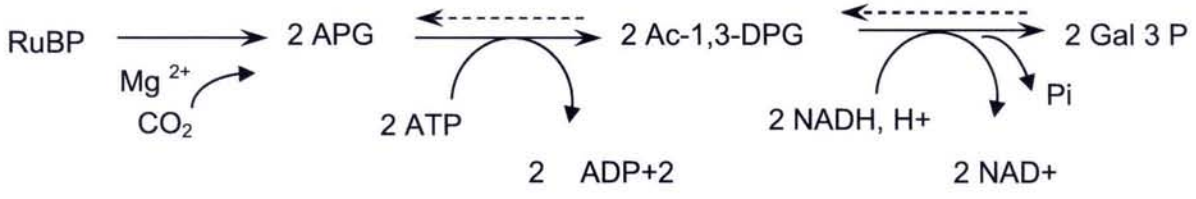
Pour la Rubisco, la Photphoenolpyruvate carboxylase (PEPc) et l'Hydroxypyruvate réductase (HPR), les mesures sont basées sur le couplage des réactions qu'elles catalysent à l'oxydation d'un même composé, le NADH. Le passage de l'état réduit du noyau nicotinamide à sa forme oxydée entraîne une diminution de son absorbance spécifique à 340 nm ; il suffit donc de déterminer le nombre de molécules de NADH oxydées pour retrouver quelle quantité de substrat a été transformée par chaque enzyme.

Les mesures d'activité de la Glycolate oxydase (GO) et la Glutamine synthétase (GS) sont basées sur la formation d'autres composés (respectivement la Glyoxylate PhenylHydrazone et le γ-glutamylhydroxamate).

Pour chaque extrait, un dosage témoin et deux essais sont réalisés.

IV.4.2. RubisCO, fonction carboxylase (EC 4.1.1.39)

On mesure ici la capacité *in vitro* de l'enzyme à combiner une molécule de CO_2 à une molécule de Ribulose bisPhosphate (RuBP) selon le mécanisme réactionnel suivant :



Le milieu réactionnel utilisé est celui décrit par Dalstein *et al.* (2002) :

Bicine-KOH (pH 8): 100 mM; **ATP**: 3.5 mM; **$NaHCO_3$** : 25 mM; **NADH**: 0.25 mM; **CP**: 5 mM; **CPK** : 5u/ml ; **$MgCl_2$** : 20 mM ; **Gal-3-PDH** : 5 u/ml ; **3-PGK** : 5 u/ml .

La réaction enzymatique est déclenchée par addition de **RuBP** 0.5 mM.

➢ *Activités Initiale et Totale de l'enzyme*

L'activité initiale est mesurée immédiatement après addition du RuBP dans le mélange réactionnel (le milieu de dosage aura été préalablement apporté à 30°C, température optimale pour le dosage enzymatique).

Pour déterminer l'activité totale, le mélange extrait brut + milieu réactionnel est mis à incuber au bain-marie à 30°C durant 15 minutes avant d'ajouter le RuBP. Cette étape a pour but d'activer l'ensemble des enzymes présentes dans l'extrait grâce à une température et une teneur en CO_2 optimales.

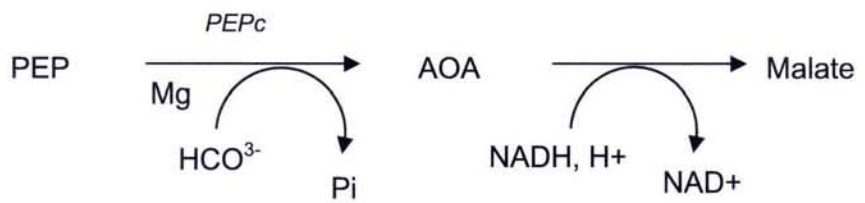
➢ *Pourcentage d'activation de la Rubisco*

Le pourcentage d'activation de la Rubisco est déterminé en fonction des activités initiales et totales de l'enzyme selon l'équation (Luomala *et al.*, 2003):

$$\% \text{ activation Rubisco} = \frac{\text{Activité initiale}}{\text{Activité totale}} \times 100$$

IV.4.3. PhosphoEnol Pyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31)

Cette enzyme permet l'assimilation de carbone (HCO_3^-) dissous dans le cytosol par la voie anaplérotique de fixation du carbone. Le dosage de cette deuxième enzyme carboxylante est basé sur la réaction couplée entre la formation d'oxaloacétate (AOA) et celle du Malate, qui fait intervenir une oxydation de NADH :



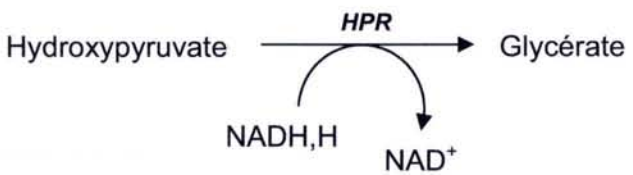
Le milieu réactionnel utilisé est décrit par Dalstein *et al.* (2002) :

Tris-HCl (pH 8): 112.5 mM ; **$MgCl_2$**: 5 mM ; **$NaHCO_3$**: 5 mM ; **NADH**: 0.2 mM ; **G6P**: 2 mM ; **MDH** : 3 u/ml.

La réaction est déclenchée instantanément par ajout de PEP 4 mM au mélange extrait brut + milieu de dosage, et l'activité de l'enzyme est suivie durant 10 minutes à 30°C après 3 minutes d'incubation à l'obscurité.

IV.4.4. HydroxyPyruvate Réductase (EC 1.1.1.29)

Le dosage se base sur la seule formation de Glycérate à partir d'Hydroxypyruvate en présence de NADH :

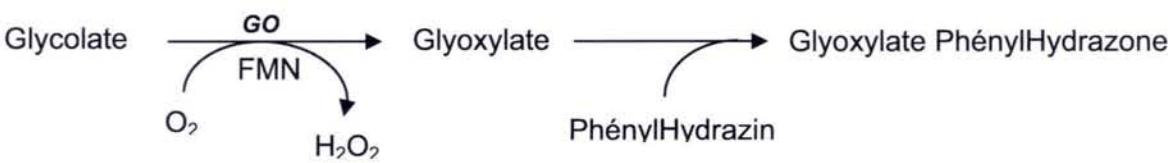


Le dosage est réalisé grâce au milieu réactionnel légèrement modifié de Van Oosten *et al.* (1992) : **KH_2PO_4 / Na_2PO_4 (pH 5.8)** : 50 mM ; **NADH** : 0.33 mM.

La réaction est déclenchée par ajout d'**Hydroxypyruvate - KOH (pH 5.8)** : 4 mM ; et l'activité est mesurée à 30°C durant 10 minutes après 3 minutes d'incubation à l'obscurité.

IV.4.5. Glycolate oxydase (EC 1.1.3.1.)

Cette enzyme induit, en présence de son cofacteur la Flavine MonoNucleotide (FMN), la formation de Glyxolate et d'eau oxygénée à partir de glycolate et d'oxygène. Le dosage est basé sur la réaction spontanée entre le glyoxylate et la phénylhydrazine qui donne le Glyoxylate PhenylHydrazone, un composé qui absorbe dans les UV à 324 nm:



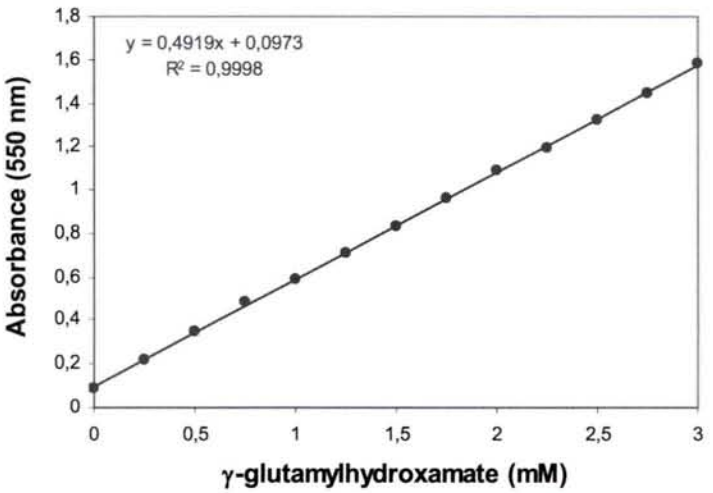


Figure 13: Courbe étalon de dosage du γ-glutamylhydroxamate par le chlorure de fer.

La composition du milieu réactionnel est celle, légèrement modifiée, de Feierabend & Beevers (1972) et Van Oosten *et al.* (1992) :

Bicine-KOH (pH 8) : 100 mM ; **PhénylHydrazine** : 3.3 mM ; **FMN** : 10 µM.

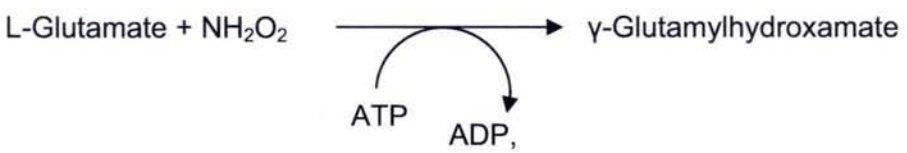
La réaction est déclenchée par l'ajout d' **acide glycolique – KOH (pH 7)** : 5 mM.

L'augmentation de l'absorbance est suivie au spectromètre Beckman DU® 640 durant 10 minutes, après 3 minutes d'incubation à l'obscurité.

IV.4.6. Glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), dosage biosynthétique

La GS présente une activité réversible, orientée soit vers la biosynthèse de Glutamine à partir de Glutamate (réaction que l'on cherche à cibler ici), soit vers la réaction inverse. Pour le dosage de l'activité biosynthétique de la GS, plusieurs protocoles expérimentaux étaient possibles (Winter *et al.*, 1982), dont 1 dosage spectrophotométrique par couplage enzymatique, et un dosage colorimétrique. Le dosage colorimétrique a été préféré au dosage enzymatique qui fait intervenir 3 réactions couplées, ce qui aurait induit une incertitude quant à la fiabilité des résultats.

Pour doser l'activité de la GS, l'ion ammonium assimilé dans la réaction *in vivo* est remplacé par de l'Hydroxylamine :



Lorsqu'il est mis en contact avec du Chlorure de Fer, le γ-Glutamylhydroxamate forme alors un complexe coloré que l'on peut doser à partir d'une courbe étalon (Figure 13).

Le milieu réactionnel est légèrement modifié par rapport à celui décrit par Shapiro & Stadtman (1970) : **Tris-HCl (pH 7.6)** : 50 mM ; **MgSO4** : 20 mM ; **Hydroxylamine** : 30 mM ; **EGTA** : 4 mM ; **L-Glutamate** : 80 mM ; **ATP** : 8 mM. (Le milieu utilisé pour les échantillons témoins ne contient ni Glutamate ni ATP).

Le mélange extrait + milieu est mis à incuber durant 30 minutes à 30°C, puis la réaction est stoppée par addition d'un mélange acide de composition : **$FeCl_3$** : 370 mM ; **TCA** : 200 mM ; **HCl** : 670 mM. Les échantillons sont laissés 20 minutes à température ambiante, sans agitation, avant de mesurer l'absorbance à 540 nm.

IV.4.7. Calcul des activités spécifiques des différentes enzymes étudiées

Les activités enzymatiques sont exprimées en nanokatal : 1 nanokatal correspond au nombre de nanomoles de substrat transformées par seconde et par milligramme de protéines solubles.

Chaque substrat est qualifié par son coefficient d'extinction molaire ε, qui correspond à la variation d'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée à travers une cuve de 1 cm de large provoquée par la transformation d'une nanomole de ce composé par ml.

$$\varepsilon\ (NADH) = 0.00622 \qquad \varepsilon\ (PhenylHydrazone) = 0.017$$

Connaissant la vitesse de réduction de l'absorbance (ΔA/min), on retrouve le nombre de nanokatals présents dans l'extrait par la formule :

$$\text{Activité spécifique} = 1000 \times \frac{\Delta A/\text{min} * 1/60 * \varepsilon}{\text{vol.extrait (µl)} * \text{concentration protéique}}$$

IV.5. Dosage du saccharose

- 10 mg de poudre sèche de feuilles sont mis dans un tube Eppendörf et repris par 750 µl de mélange Méthanol / Chloroforme / Eau (12 / 5 / 3, v / v / v) qui permet de détruire toutes les membranes biologiques et donc de récupérer le saccharose total foliaire. Le mélange est maintenu à température ambiante durant 10 minutes, avec un passage au vortex toutes les 2 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 17 000 *g* durant 5 minutes. Le surnageant de chaque tube est soigneusement prélevé et conservé, et le culot est à nouveau repris dans 750 µl de mélange M/C/E. L'opération est renouvelée trois fois de suite.

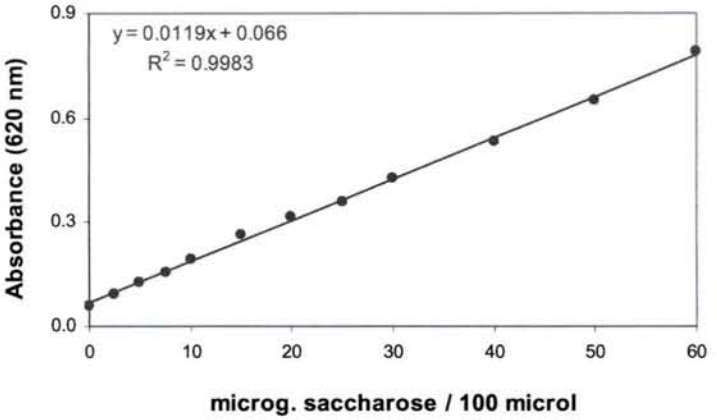


Figure 14: Courbe étalon de dosage du Saccharose à l'anthrone.

Le dosage du saccharose est effectué uniquement sur le surnageant, la mise au point du protocole ayant démontré que la quantité de saccharose présente dans les culots après trois rinçages était négligeable.

- 1 ml de surnageant est mélangé à 0.6 ml d'eau distillée afin de modifier les proportions entre Méthanol, Chloroforme et Eau. Les tubes sont centrifugés durant à 10 000 rpm sur une centrifugeuse de paillasse (centrifugeuse Beckman Avanti 30 Centrifuge), puis mis au repos 5 minutes. Ceci à pour but de séparer la phase aqueuse de la phase lipidique du mélange.
- 100 µl de phase aqueuse sont repris avec 100 µl de KOH (30 %, m/v), et les tubes sont incubés 20 minutes au bain-marie à 100°C (bouchon fermé). Passé ce délai, les tubes sont immédiatement plongés dans la glace pour stopper la réaction de destruction des sucres réducteurs.
- Le contenu des tubes est enfin mélangé à 1.5 ml d'Anthrone (150 mg / 100 ml acide sulfurique diluée). Les tubes sont laissés 20 minutes dans une étuve à 40°C, puis l'absorbance du mélange est mesurée à 620 nm (Spectrophotomètre Beckman DU® 640) contre une gamme étalon de saccharose (de 0 à 60 µg / 100 µl) (figure 14).

Un protocole a été recherché pour le dosage de l'amidon dans les culots simultanément à celui du saccharose dans le surnageant, mais la présence de phénols et tannins a fortement perturbé les analyses, sans que l'on puisse trouver de solution à court terme pour remédier à ce problème. Une mise en place de protocole adapté à ces échantillons devra être faite pour pouvoir effectuer correctement ces analyses.

IV.6. Quantification des pigments photosynthétiques

Les pigments photosynthétiques (Chlorophylles a et b, Caroténoïdes) ont été extraits au Diméthyle Sulfoxyde (DMSO).

30 mg de matière fraîche sont incubés durant 6 heures dans 5 ml de DMSO, dans un bain-marie à 60 °C. L'absorbance du surnageant est mesurée contre un blanc (DMSO seul) à 480, 649 et 666 nm sur le spectrophotomètre Beckman DU® 640.

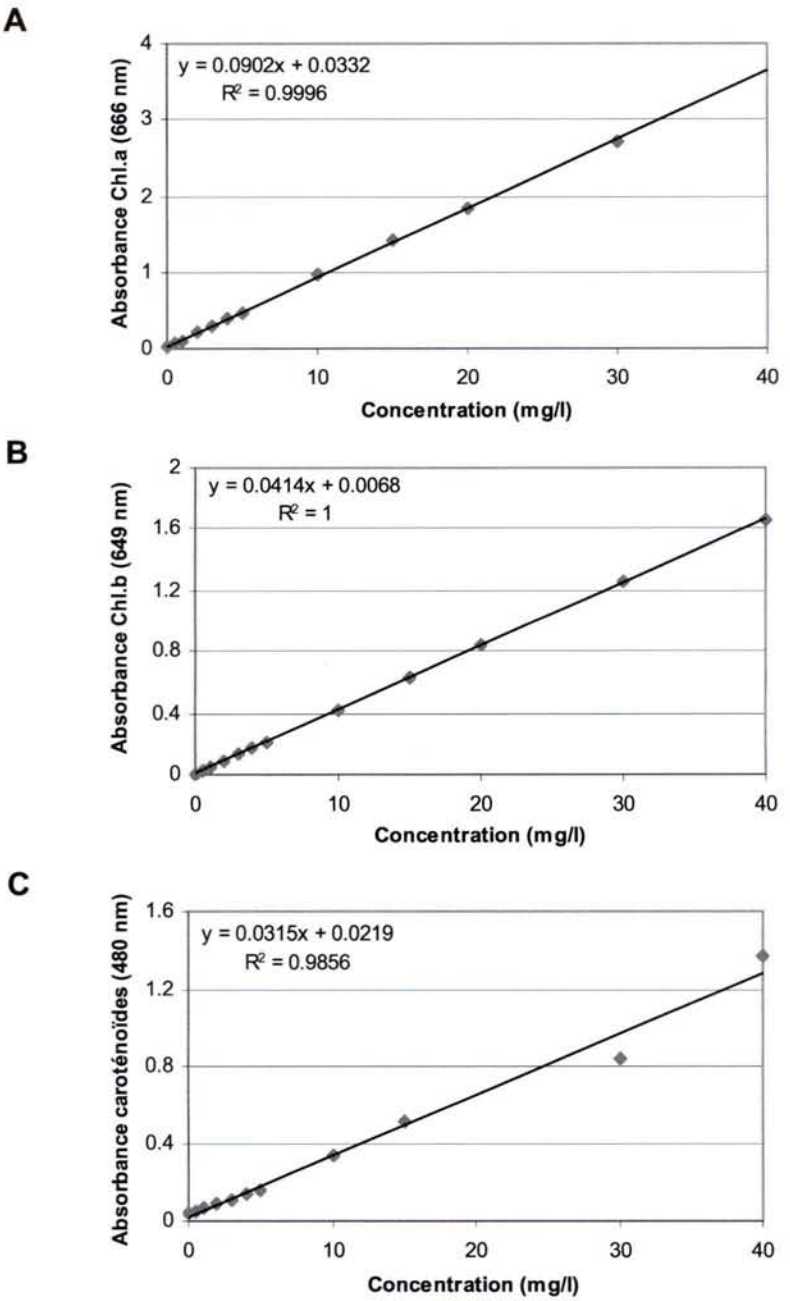


Figure 15: Courbes étalons de dosage de la chlorophylle a (A), la chlorophylle b (B) et des caroténoïdes (C) au DMSO.

Une gamme étalon est réalisée pour chaque pigment à partir d'extraits partiellement purifiés d'épinard (Figure 15). Les concentrations en mg/l de **chlorophylle *a* (Chl.a)**, **chlorophylle *b* (Chl.b)** et **caroténoïdes (Carot)**, sont données par des formules, recalculées d'après Lichtenthaler (1987) en fonction des propriétés de l'appareil de mesure (méthode présentée en ANNEXE 6).

Pour le spectrophotomètre Beckman DU® 640 utilisés ici, les équations obtenues sont :

$$\mathbf{Chl.a = 14.413 \cdot A_{666} - 8.58 \cdot A_{649}}$$

$$\mathbf{Chl.b = 47.289 \cdot A_{649} - 18.131 \cdot A_{666}}$$

$$\mathbf{Carot. = (1000 \cdot A_{480} - 0.018 \cdot Chl.a - 0.036 \cdot Chl.b) / 220}$$

Les concentrations en pigments sont ensuite ramenées par unité de matière fraîche, de matière sèche, par unité de surface foliaire ou teneur en azote de la feuille.

V. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES PHYSIOLOGIQUES

L'ensemble des traitements statistiques est effectué grâce au logiciel Statistica version 6.1© (Statsoft, Pairs, France).

➢ *Normalisation des données*

La normalité des distributions des données est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (distribution non normale si la probabilité est <0.2). Pour les caractères n'ayant pas une distribution normale, les données sont recalculées en prenant le logarithme de chaque point.

Un premier tri des données permet ainsi d'éliminer les résultats aberrants dans chaque jeu de données (points largement en dehors des distributions normales).

➢ *Comparaison des effets du CO_2 et de la date de prélèvement*

Chaque génotype étant cloné et échantillonné dans 4 conditions différentes (CO_2 : 360 ou 700 vpm ; Date de prélèvement : Flush 2 ou Flush 3), la variabilité entre les résultats est analysée simultanément par ANOVA et par un test t pour échantillons appariés, avec des seuils de probabilité fixés à $p<0.01$ et $p<0.05$.

➢ *Test de Spearman de conservation des rangs*

Un test de corrélation non-linéaire de Spearman est réalisé pour les distributions de populations relatives à certains caractères analysés. L'ordre des rangs est conservé de manière significative à la probabilité $p<0.05$.

➢ *Corrélations entre les différents caractères étudiés*

Une matrice de corrélation est réalisée avec le test de Pearson pour chaque couple de caractères (par caractère, on entend un trait analysé, par exemple la quantité de Rubisco, ou l'assimilation carbonée nette). Une corrélation est considérée comme significative à $p<0.05$.

VI. RECHERCHE DE QUANTITATIVE TRAIT LOCI (QTLs)

Les deux cartes génétiques des chênes pédonculés parentaux (*Quercus robur* L.) utilisées pour les analyses de QTLs ont été réalisées à partir de 94 individus plein-frères de génération F1 (Barreneche *et al.*, 1998, http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/ii.html#Oak). Les deux cartes sont saturées, 12 groupes de liaisons ayant été mis en évidence chez les deux parents diploïdes. Sur les 12 groupes de liaison, 10 sont similaires entre les deux parents, caractérisés par plusieurs marqueurs identiques. Les groupes de liaisons sont présentés en ANNEXE 7.

Toutes les analyses de QTLs ont été effectuées grâce au logiciel MultiQTL© version 2.5 (MultiQTL ltd, Insitute of Evolution, Haifa University, Israel; http://esti.haifa.ac.il/~poptheor ou http://www.multiQTL.com). La recherche de QTLs s'est déroulée en plusieurs étapes:

➢ *Interval Mapping*

Cette première analyse permet de détecter la présence de QTLs putatifs sur les intervalles entre marqueurs des différents groupes de liaison, en faisant une recherche à partir d'un modèle à simple QTL ou d'un modèle à 2 QTLs liés. Le LOD (Logarithm of the Odds Ratio) correspond au seuil de détermination des QTLs (Lander & Botstein, 1989), et sa valeur seuil a été fixée à 2 pour la détection de QTLs putatifs simples, ou 3 pour la détection de couples de QTLs liés.

Modèle à QTL simple. Le test consiste à ne considérer que la variabilité quantitative du caractère étudiée n'est liée qu'à un QTL au plus par groupe de liaison.

Modèle à QTLs liés (Two-linked QTLs). Le logiciel permet de calculer si, pour un groupe de liaison donné, il est statistiquement plus probable d'avoir 2 QTLs plutôt qu'un seul. Il n'est pour l'instant pas possible de tester l'existence de plus de 2 QTLs liés par groupe de liaison.

➢ *Composite Interval Mapping (CIM)*

Cette seconde analyse se base sur les QTLs putatifs détectés lors de l'interval mapping et teste la probabilité d'exister de chaque QTL en supprimant les interactions qu'il peut y avoir entre eux (probabilité significative à $p_{CIM} < 0.05$) en réalisant un certain nombre de permutations entre les jeux de données (Jansen & Stam, 1994; Zeng, 1994). Le nombre de permutations réalisées a été fixé à 1 000 pour cette expérience.

➢ *Boostrap*

La dernière étape consiste à déterminer la déviation standard sur les valeurs estimées de position et d'effet pour chaque QTL à partir de 1 000 permutations des jeux de données (Visscher *et al.*, 1996). Seuls les QTLs ayant un effet significatif, i.e. strictement positif ou négatif (avec un intervalle de confiance de 95%), ont été pris en compte pour la détection de QTLs simples.

Pour chaque QTL identifié, sont notés sa probabilité au niveau du chromosome (p_{CIM}), la position des QTLs avant et après Bootstrap, le pourcentage de variance expliquée par le QTL (PEV, Percentage of Explained Variance), et l'effet allèlique du QTL sur le caractère.

➢ *Analyse Multi-Environnementale*

Une analyse Multi-Environnementale a ensuite été effectuée sur les mêmes données. **E**lle permet tout d'abord d'augmenter la puissance de détection des QTLs en regroupant les données obtenues pour différents environnements à comparer. Dans notre expérience, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à la comparaison entre les niveaux de [CO_2] dans les serres en testant l'interaction de chaque QTL avec son environnement, c'est-à-dire en comparant les effets et pourcentages de variance expliquées des QTLs entre les deux environnements.

Nous avons conservé tous les QTLs dont au moins un effet était significatif (strictement différent de 0 après analyse par Boostrap).

Le logiciel permet ensuite de créer un sous-modèle qui considère que l'effet du ou des QTLs reste identique entre les deux environnements. Nous avons donc réalisé une comparaison entre le modèle initial et le sous-modèle afin de déterminer la significativité de l'influence du changement environnemental sur l'effet du QTL (significative à $p<0.05$).

➢ *Probabilité au niveau du chromosome / du génome*

Du fait du grand nombre de tests effectués lors de l'analyse des QTLs, le seuil de détection des QTLs fixé à 5% au niveau du chromosome par le logiciel a été recalculé au niveau du génome selon l'équation (Saintagne *et al.*, 2004) : $p_{gen} = 1 - (1 - p_{CIM})^{(M/m)}$,

où M est le nombre total de marqueurs utilisés pour la détection du QTL sur la carte et m le nombre de marqueurs présents sur le groupe de liaison où le QTL a été localisé.

Les QTLs présentés sont qualifiés en fonction de la valeur de p_{gen}:

QTLs significatifs : $p_{gen} < 0.05$ ***

QTLs putatifs : $0,05 < p_{gen} < 0.1$ **

$0,1 < p_{gen} < 0.15$: *

➢ *Cartographie des QTLs*

Les cartes génétiques mâle et femelle ainsi que les QTLs détectés sont représentés graphiquement grâce au logiciel MapChart 2.1© (R.E.Voorrips, 1999-2002 ; Copyright Plant Research International, http://www.joinmap.nl).

RESULTATS

RESULTATS

PREAMBULE : Le climat des serres et la répétitivité des résultats

Les données climatiques des serres sont reportées dans le Tableau 1.

Le critère de choix des jours de prélèvement et de mesures s'étant porté sur des jours d'ensoleillement maximum (ciel non couvert), l'éclairement a toujours été optimal (PPFD minimum de 639 µmoles de photons.m^{-2}.s^{-1}).

La température a montré par contre plus de variations entre les jours de mesures, les serres n'étant pas climatisées et reflétant la température extérieure. Ainsi, les journées des 13 juin, 12 juillet et 28 septembre ont été plus froides et la journée du 26 juin plus chaude que les autres, ce qui est à prendre en compte dans la comparaison entre les résultats en particulier entre flushs.

L'humidité relative dans les serres a été plutôt stable durant l'été, avec toutefois une baisse progressive de sa valeur en fin de saison (fin août).

Les données obtenues sur les 10 génotypes possédant 3 répétitions chacun par serre ont montré sur l'ensemble des jeux de données une variation maximale de 10% environ des valeurs entre les clones, quels que soient les caractères étudiés.

Les données de corrélation ne seront pas rapportées dans la partie « Résultats » du fait de la quantité de corrélations obtenues, mais sont présentés en ANNEXE 8 et seront commentées lors de la discussion afin d'étayer certaines observations.

	380 vpm [CO2]	680 vpm [CO2]
Hauteur (cm)	181.63 ± 4.48 b	227.91 ± 5.04 a
Diamètre (cm)	15.86 ± 0.25 b	17.45 ± 0.26 a
Biomasse Feuilles (g)	39.32 ± 1.21 b	53.44 ± 1.46 a
Biomasse Tiges (g)	98.14 ± 3.74 b	142.38 ± 4.64 a
Biomasse Racines (g)	42.45 ± 1.97 b	64.92 ± 2.90 a
Biomasse Totale (g)	179.91 ± 6.50 b	260.74 ± 8.36 a
R/A	0.5 ± 0.007 b	0.527 ± 0.007 a

Tableau 2 : Hauteur, diamètre et biomasse finales (± erreur standard; *n = 183*) des chênes pédonculés soumis à 380 ou 680 vpm de [CO_2] et rapport, entre la biomasse racinaire et la biomasse aérienne (R/A).

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à p<0.05).

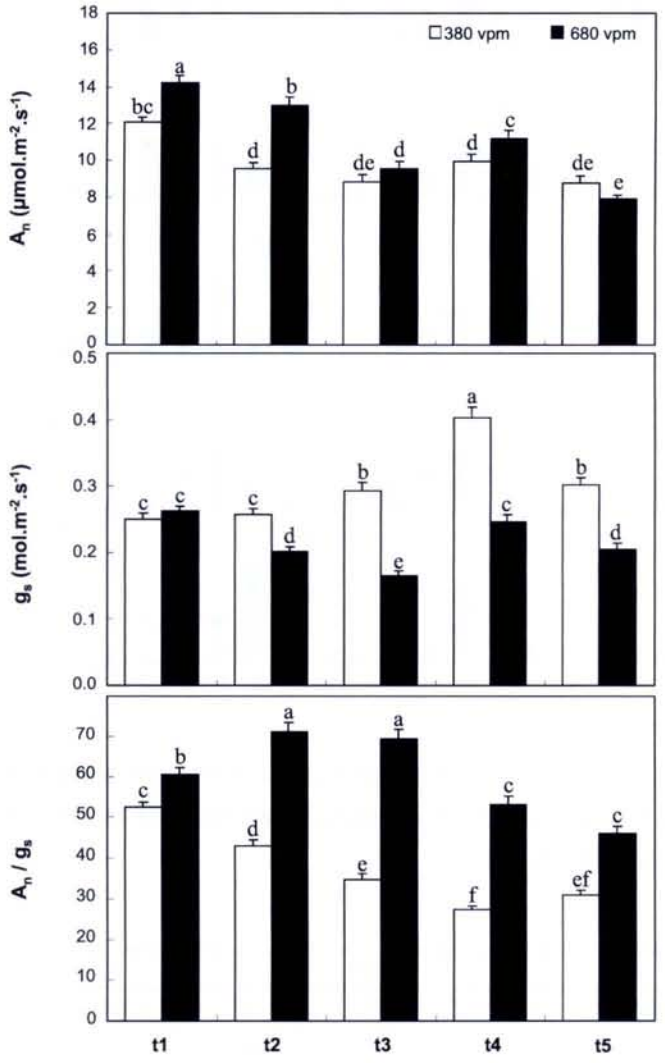


Figure 16 : Variation de l 'assimilation carbonée nette A_n, de la conductance stomatique g_s (B) et du rapport entre les deux (C) (moyenne ± erreur std) en fonction de la concentration atmosphérique en [CO_2] et du flush étudié (t1 = flush 1; t2 = flush 2; t3,4,5 = flush 3).

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à p<0.05). : net CO_2 Assimilation (µmol.m^{-2}.s^{-1}); **b**: stomatal conductance to water (mol.m^{-2}.s^{-1}); **c**: ratio A/g (calculated intrinsic Water Use Efficiency WUEi).

	Flush 1	Flush 2	Flush 3				
	t1	t2	t3	t4	t5	Moyenne Flush 3	Moyenne générale
An	0.3593 ***	0.2659 ***	0.2131 **	0.2797 ***	0.2319 **	0.2723 ***	0.2723 ***
gs	0.1329 ns	0.2491 **	0.2150 **	0.4009 ***	0.1748 *	0.3154 ***	0.4028 ***
An/gs	0.1494 *	-0.3310 ns	0.1740 *	0.0821 ns	0.2013 **	0.1862 *	0.2295 **

Tableau 3 : Coefficients de corrélation (r) entre les échanges gazeux mesurés sur les arbres soumis à 380 et 680 vpm [CO_2] en fonction des cinq principales dates de mesure (t1 à t5), et des moyennes sur le flush 3 seul ou sur l 'ensemble des valeurs.

*Les étoiles indiquent la significativité du test (***: p<0.001; **: p<0.01; *: p<0.05).*

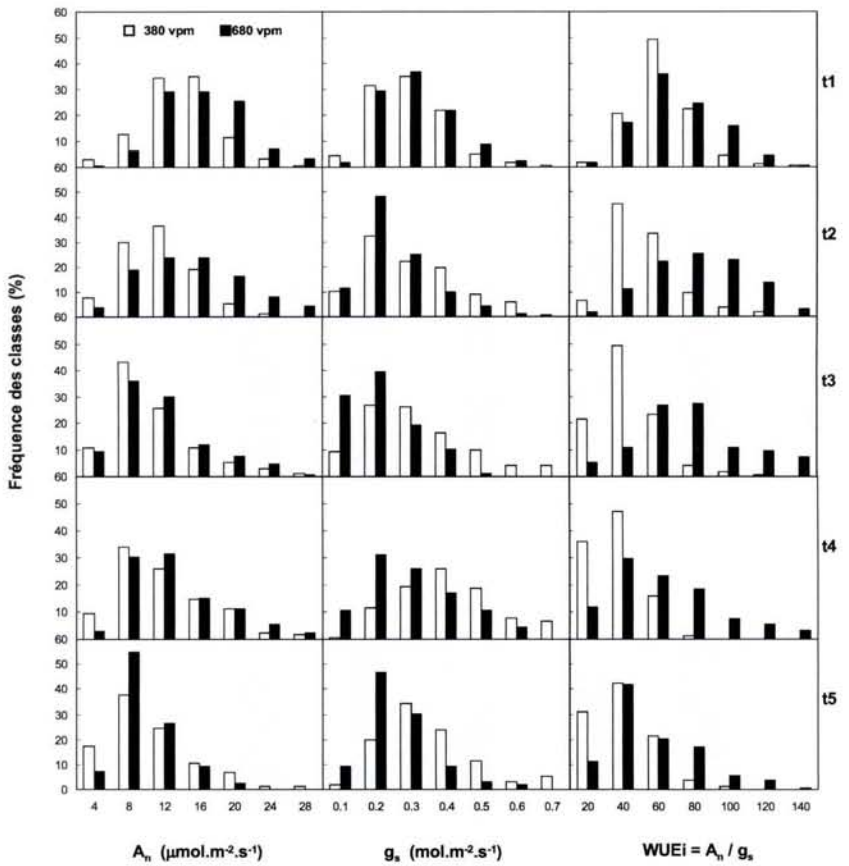


Figure 17: Fréquences de distribution des chênes classés selon les valeurs d'échanges gazeux observées dans les serres à 380 et 780 vpm [CO_2] aux cinq dates de mesures (*n = 183* ; t1 = flush 1; t2 = flush 2; t3 à t5: flush 3).

	t1		t2		t3		t4		t5	
A_n	0.302	***	0.264	***	0.297	***	0.195	*	0.241	**
g_s	0.188	*	0.256	**	0.201	***	0.235	**	0.093	ns
A_n/g_s	0.195	*	0.031	ns	0.162	*	-0.047	ns	0.225	*

Tableau 4 : Coefficients de Spearman caractérisant la conservation des rangs des individus dans les distributions des populations à 380 et 680 vpm [CO_2] en fonction de l'assimilation carbonée nette, la conductance stomatique et le ratio entre les deux, pour les cinq principales dates de mesure d 'échanges gazeux (t1 à t5).

*Les étoiles indiquent la significativité du test (***: p<0.001; **: p<0.01; *: p<0.05).*

I CROISSANCE

La croissance est stimulée chez les arbres exposés à 680 vpm [CO_2] par rapport aux plants témoins (Tableau 2), avec des augmentations significatives de la *croissance en hauteur et en diamètre* respectivement de 25.5 et 10%.

La biomasse totale des individus est de 45% plus élevée pour les arbres ayant poussé sous fort [CO_2] que pour les arbres sous [CO_2] ambiant, et les trois principales parties des arbres ont présenté une augmentation significative de biomasse. La biomasse racinaire a été plus nettement favorisée (+52.9%) que la biomasse foliaire (+35.9%) ou caulinaire (+45.1%), avec un rapport final R/A (partie racinaire / partie aérienne) significativement plus élevé (+5.5%) sous 680 vpm [CO_2] que sous 380 vpm.

II. ECHANGES GAZEUX

II.1. Assimilation nette carbonée A_n

L'assimilation carbonée est significativement plus élevée dès le début de l'expérience pour les arbres exposés au fort [CO_2] que pour les témoins (Figure 16), les feuilles des deux premiers flushs montrant des assimilations plus élevées de +18.2 et +36% respectivement pour les flush 1 et 2. Pour les feuilles du troisième flush, l'écart entre les deux traitements [CO_2] s'amenuise, et n'est significatif qu'à la date t4 (+12.7%), et on observe même une inversion claire mais non significative de la tendance en fin de saison (t5) (-10% de photosynthèse sous fort [CO_2]). Malgré tout, les mesures effectuées à 380 et 680 vpm [CO_2] sont toujours corrélées de manières significatives tout au long de la saison (Tableau 3).

La distribution des deux groupes de chênes est sensiblement la même, mais elle est décalée vers les plus fortes valeurs d'assimilation pour les deux premiers flushs des chênes ayant poussé sous 680 vpm [CO_2] (Figure 17), cette différence n'étant plus aussi nette pour le troisième flush. Au cours de toute l'expérience, les arbres ont conservé leur rang dans la distribution, comme le montre le test de Spearman (Tableau 4), même si la significativité est un peu moins forte en fin de saison.

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Pourcentage en eau (%)	61.74 ± 0.23 a	59.6 ± 0.32 b	61.40 ± 0.17 a	61.79 ± 0.16 a
Surface Foliaire moyenne (cm^2)	19.92 ± 0.47 a	19.06 ± 0.48 a	17.75 ± 0.46 b	17.94 ± 0.50 b
Surface Foliaire Spécifique (SLA, $cm^2.g^{-1}$)	158.84 ± 1.82 a	139.16 ± 2.04 c	151.12 ± 2.00 b	144.77 ± 2.17 bc

Tableau 5 : Caractéristiques massiques et surfaciques (± erreur standard; *n = 183*) des feuilles prélevées sur les flushs 2 et 3 sous 380 et 680 vpm de [CO_2].

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

II.2. Conductance stomatique g_s

Les feuilles du premier flush exposées à 680 vpm [CO_2] ne présentent pas de variation de la conductance stomatique par rapport à celles sous 380 vpm (Figure 16), les deux séries de mesures n'étant d'ailleurs pas corrélées (Tableau 3). La réponse de la conductance est ressentie dès le deuxième flush avec une diminution significative de sa valeur de 21.5% par rapport au [CO_2] ambiant. Cette différence est accentuée au début du troisième flush (t3), avec une diminution de 43.7% de la conductance sous fort [CO_2], puis tend à se réduire légèrement à t4 et t5 (respectivement –39.1% et –32.1% de différence), tout en restant très significative. Pour les flushs 2 et 3, les conductances mesures à [CO_2] élevé sont corrélées à celles mesurées à [CO_2] ambiant (Tableau 3), malgré des degrés de significativité variables et des coefficients de corrélation relativement bas.

La répartition de la population par rapport aux mesures de conductance montre sensiblement la même évolution (Figure 17), mais avec une distribution légèrement plus resserrée pour les arbres soumis à 680 vpm [CO_2] par rapport aux témoins qui conservent globalement leur distribution et leur niveau de conductance. Les rangs des différents génotypes sont conservés de manière modérément significative pour les quatre premières mesures (Tableau 4), mais ne sont pas conservés à la fin de l'étude (t5).

III. CARACTERISTIQUES FOLIAIRES

III.1. Pourcentage en eau des feuilles et surface foliaire spécifique

Les données foliaires sont présentées dans le Tableau 5.

Le *pourcentage en eau des feuilles* est relativement stable (61.6% en moyenne), excepté pour les feuilles du flush 2 ayant poussé sous 680 vpm [CO_2], qui ont une teneur en eau légèrement mais significativement plus faible (-3.5%) que pour les autres.

La *surface foliaire moyenne* estimée sur les 6 feuilles collectées diminue significativement dans le troisième flush par rapport au second (en moyenne –1.7 cm^2), mais n'est pas modifiée par le traitement CO_2.

	Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**
Azote ($g.m^{-2}$)	2.05 ± 0.03 a	1.90 ± 0.03 b
Azote ($g.g^{-1}$MS)	30.46 ± 0.31 a	26.84 ± 0.36 b
% Azote foliaire	3.04 ± 0.03 a	2.69 ± 0.04 b
% Carbone foliaire	47.73 ± 0.06 b	48.15 ± 0.07 a
C/N	15.97 ± 0.17 b	18.48 ± 0.25 a

Tableau 6 : Composition foliaire en carbone et azote des feuilles du 3ème flush (± erreur standard; *n = 183*) soumises à 380 ou 680 vpm de [CO_2].

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Protéines Totales ($g.m^{-2}$)	8.99 ± 0.15 b	8.28 ± 0.19 c	9.74 ± 0.16 a	9.31 ± 0.24 ab
Protéines Totales ($mg.g^{-1}$ MS)	139.25 ± 2.68 a	112.83 ± 3.16 c	145.23 ± 2.40 a	128.71 ± 2.49 b
Protéines Totales ($g.g^{-1}$ N)			4.81 ± 0.07 a	4.85 ± 0.09 a
Protéines Solubles ($g.m^{-2}$)	7.87 ± 0.25 b	7.91 ± 0.33 ab	8.91 ± 0.35 a	9.30 ± 0.50 a
Protéines Solubles ($mg.g^{-1}$ MS)	121.36 ± 3.94 ab	105.56 ± 4.34 b	133.12 ± 5.16 a	125.87 ± 4.79 a
Protéines Solubles ($g.g^{-1}$ N)			4.39 ± 0.16 a	4.73 ± 0.16 a

Tableau 7 : Teneurs en protéines totales et solubles (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles à 380 ou 680 vpm [CO_2], et prélevées au 2ème et 3ème flushs de croissance. Les teneurs sont exprimées soit en fonction de la surface foliaire, soit en fonction de la masse sèche, soit en fonction de la teneur en azote foliaire.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

La *surface foliaire spécifique (SLA)* est significativement plus basse (-4.9%) dans le flush 3 que dans le flush 2 des arbres « témoins » (380 vpm [CO_2]) mais la différence n'est plus significative sous CO_2 élevé (+4%). La SLA est abaissée sous fort [CO_2] par comparaison aux données obtenues à [CO_2] ambiant, de façon significative pour le second flush (-12.4%) mais plus pour le troisième flush (-4.2%).

III.2. Concentrations en azote et carbone dans les feuilles

Ces valeurs n'ont été mesurées que sur le 3ème flush (en même temps que les mesures de discrimination isotopique) et sont présentées dans le Tableau 6.

Le *pourcentage en azote* contenu dans les feuilles est significativement plus faible lorsque les arbres ont été soumis à un fort [CO_2] que pour les plants témoins (-11.5%). Exprimée par unité de surface ou de masse foliaire, la teneur en azote diminue sous fort [CO_2] respectivement de –7.3 et –11.9%.

Le *pourcentage en carbone* foliaire est à l'inverse très légèrement plus fort (+0.9%) sous [CO_2] élevé que sous [CO_2] ambiant, mais la différence est malgré tout significative.

Le *rapport C/N* est très significativement plus élevé (+15.7%) dans les feuilles de chênes ayant poussé sous 680 vpm [CO_2] que dans celles ayant poussé sous 380 vpm [CO_2].

IV. TENEURS EN PROTEINES

IV.1. Protéines totales

La concentration en protéines totales est plus élevée dans les feuilles du flush 3 que du flush 2 (Tableau 7). La différence entre les deux flushs est plus prononcée chez les arbres soumis à au [CO_2] élevé et plus significative lorsque la teneur en protéines est exprimée par unité de surface (+12.4% sous fort [CO_2] au lieu de +8.3% sous [CO_2] ambiant) que par unité de masse (+14% sous [CO_2] élevé, mais pas de variation significative sous [CO_2] ambiant).

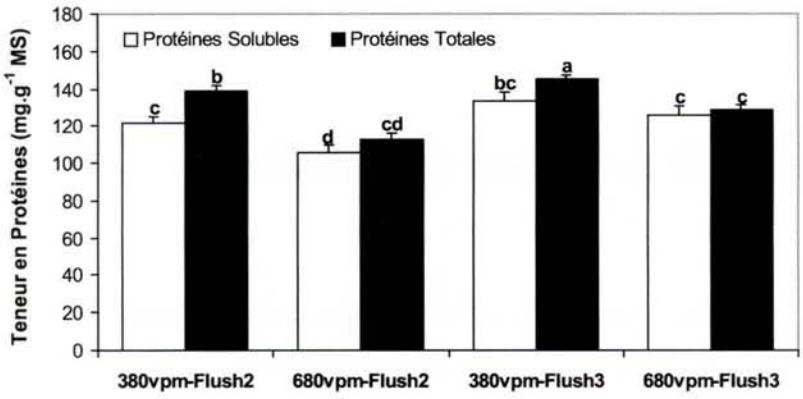


Figure 18 : Teneurs en protéines solubles et totales (moyenne ± erreur std; n=100) dans les feuilles du 2ème et 3ème flush à 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

La quantité de protéines totale est plus faible dans les feuilles les arbres soumis à un fort [CO_2] que pour les arbres ayant poussé sous [CO_2] ambiant (Tableau 7). Cette différence est significative pour les feuilles du flush 2 (-7.9%) mais pas pour celles du flush 3 (-4.4%) lorsque la teneur en protéines totales est exprimée par unité de surface foliaire, et elle est significative pour les deux flushs lorsqu'elle est exprimée par unité de masse (respectivement -19 et –11.4% pour les flushs 2 et 3).

IV.2. Protéines solubles

La quantité de protéines solubles est plus élevée dans les feuilles du 3ème flush que dans les feuilles du 2ème flush (Tableau 7), de façon plus importante sous fort [CO_2] (environ +18% selon le mode d'expression de la concentration en protéines) que sous [CO_2] ambiant.

La modification de la concentration en [CO_2] dans l'air n'induit pas de variation significative en protéines solubles dans les feuilles, même si la tendance générale est à la diminution de cette teneur.

IV.3. Investissement de l'azote dans les protéines

Les quantités de protéines totales ou solubles dans les feuilles du 3ème flush ne varient pas entre les deux traitements [CO_2] lorsqu'elles sont exprimées par gramme d'azote (Tableau 7).

La proportion en protéines solubles par rapport aux protéines totales est réduite lorsque les plants sont exposés à un fort [CO_2] (Figure 18), la différence entre les deux devenant alors non-significative. Cette tendance est encore plus visible pour le 3ème flush que pour le second.

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Quantité Rubisco ($g.m^{-2}$)	2.83 ± 0.08 a	2.25 ± 0.06 b	2.95 ± 0.06 a	2.34 ± 0.08 b
Quantité Rubisco ($mg.g^{-1}$ MS)	44.46 ± 1.39 a	31.30 ± 1.08 b	43.62 ± 1.28 a	32.95 ± 1.11 b
% Rubisco ($g.100\ g^{-1}$ Protéines totales)	32.69 ± 0.79 a	28.53 ± 0.98 bc	30.37 ± 0.68 ab	25.59 ± 0.75 c
% Rubisco ($g.100\ g^{-1}$ Protéines solubles)	40.81 ± 1.64 a	34.11 ± 1.98 bc	39.18 ± 2.00 ab	28.82 ± 1.42 c
% $N_{Rubisco}$ (g $N_{Rubisco}$.$100\ g^{-1}$ N_{total})			23.84 ± 0.66 a	19.43 ± 0.51 b

Tableau 8 : Teneur en Rubisco (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles de chêne pédonculé soumis à 380 ou 680 vpm [CO_2], et prélevées au 2ème et 3ème flushs de croissance. Les teneurs sont exprimées en fonction de la surface foliaire ou de la masse sèche. Les pourcentages de protéines totales et solubles alloués à la Rubisco sont indiqués, ainsi que le pourcentage d 'azote foliaire contenu dans les enzymes de Rubisco.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

V. REPONSES DE LA RUBISCO AU FORT [CO_2]

V.1. Teneur en Rubisco dans les feuilles

V.1.1. Quantité mesurée

La quantité de Rubisco ne varie pas significativement d'un flush à l'autre, qu'elle soit exprimée par unité de surface foliaire ou de masse (Tableau 8).

La quantité de Rubisco est par contre significativement réduite dans les feuilles lorsque les arbres sont exposés à un [CO_2] élevé. Lorsque la quantité de Rubisco est exprimée par unité de surface, cette diminution est en moyenne de –20.6% pour les deux flushs étudiés. Lorsque la Rubisco est exprimée par unité de masse, l'écart de concentration entre les deux traitements CO_2 est plus prononcé dans le deuxième flush (-29.6%) que dans le troisième (-24.5%).

V.1.2. Proportion d'azote investi dans la Rubisco

La quantité de protéines contenues dans les feuilles sous forme de Rubisco ne varie pas entre les deux flushs, mais diminue lorsque les arbres sont soumis au fort [CO_2] de façon significative, et accentuée dans le flush 3 par rapport au flush 2 (Tableau 8).

La quantité de protéines totales mesurée dans les feuilles et contenue sous forme de Rubisco est de –12.7% inférieure pour les feuilles du second flush sous [CO_2] élevé par rapport aux témoins, et de –15.7% pour le troisième flush. Ces différences s'élèvent respectivement à –16.4 et –26.4% pour la proportion en Rubisco dans les protéines solubles.

La fraction d'azote contenue dans la Rubisco diminue également de –18.5% par rapport à la teneur en azote totale de la feuille pour les arbres ayant poussé sous 680 vpm [CO_2] par rapport aux arbres ayant poussé sous 380 vpm[CO_2].

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Activité totale (nkat.mg^{-1} prot.solubles)	12.21 ± 0.54 b	10.64 ± 0.65 c	14.81 ± 0.66 a	10.99 ± 0.52 c
Activité totale (nkat.mg^{-1} Rubisco)	28.69 ± 0.32 b	28.41 ± 1.92 b	35.89 ± 1.91 a	32.48 ± 1.48 ab
Activité initiale (nkat.mg^{-1} prot.solubles)	7.32 ± 0.32 b	6.09 ± 0.42 c	9.12 ± 0.42 a	6.15 ± 0.32 c
Activité initiale (nkat.mg^{-1} Rubisco)	16.98 ± 0.75 b	15.83 ± 1.14 b	22.17 ± 1.25 a	18.27 ± 0.92 ab
% Activation	60.18 ± 1.32 ab	55.77 ± 1.63 b	61.87 ± 1.33 a	56.59 ± 1.38 b

Tableau 9 : Pourcentage d 'activation, activité spécifique totale et initiale de la Rubisco (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles à 380 ou 680 vpm [CO_2], et prélevées au 2ème et 3ème flushs de croissance. Les activités sont exprimées en nanokatal par milligramme de protéines solubles présentes dans l'extrait ou par milligramme de Rubisco.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

V.2. Activité de la Rubisco

Les mesures d'activité sont présentées dans le Tableau 9.
On peut remarquer tout d'abord que l'activité de la Rubisco exprimée par mg de Rubisco est plus élevée que l'activité exprimée par mg de protéines solubles, et la différence entre les deux jeux de données est encore plus importante pour le flush 3 que pour le 2ème flush (+143% au lieu de +133% pour les arbres témoins, +196% au lieu de +164% en moyenne pour les arbres sous $[CO_2]$ élevé).

V.2.1. Activité spécifique initiale

Dans les arbres ayant poussé sous 380 vpm $[CO_2]$, l'activité initiale est significativement plus forte dans le 3ème flush que dans le second, qu'elle soit exprimée par mg de protéines solubles (+24.6%) ou par mg de Rubisco (+30.6%). Par contre, malgré une légère hausse de la valeur de l'activité, la différence entre les flushs n'est plus significative lorsque les arbres sont placés sous 680 vpm $[CO_2]$ (+1% et +15.4%).

La croissance des arbres ont poussé sous $[CO_2]$ élevé plutôt que sous $[CO_2]$ ambiant entraîne une diminution significative de l'activité initiale de la Rubisco exprimée par mg de protéines solubles, plus prononcée pour le 3ème flush (-32.6%) que pour le 2ème (-16.8%). Par contre, si l'activité est exprimée par mg de Rubisco, l'activité initiale est plus basse sous fort $[CO_2]$, mais pas de manière significative, quel que soit le flush.

V.2.2. Activité spécifique totale

De la même façon que pour l'activité initiale, l'activité totale est significativement plus élevée pour les feuilles du flush 3 par rapport au flush 2 à 380 vpm $[CO_2]$ (+21.3% ou +25.1% selon qu'elle est exprimée par mg de protéines ou de Rubisco), mais la différence entre les flushs n'est plus significative lorsque les arbres ont poussé sous 680 vpm $[CO_2]$ (+3.3% et +14.3%).

L'activité spécifique totale de la Rubisco exprimée par mg de protéines solubles est plus basse sous fort $[CO_2]$ que sous $[CO_2]$ ambiant, mais avec des différences moindres que pour l'activité initiale (-12.9% pour le second flush, -25.8% pour le troisième flush). L'activité exprimée par mg de rubisco reste significativement inchangée par le traitement $[CO_2]$ dans les deux flushs.

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Activité PEPc	1.83 ± 0.10 b	1.68 ± 0.12 b	2.60 ± 0.18 a	2.30 ± 0.14 a
Activité GO	0.91 ± 0.06 b	0.88 ± 0.09 b	1.49 ± 0.11 a	1.07 ± 0.07 b
Activité HPR	37.20 ± 1.55 b	35.19 ± 1.54 b	44.47 ± 2.21 a	34.75 ± 1.47 b
Activité GS biosynthétique	1.21 ± 0.06 c	1.14 ± 0.06 c	1.94 ± 0.14 a	1.48 ± 0.07 b

Tableau 10 : Activités spécifiques (en nanokat.mg^{-1} protéines solubles) de la PhosphoenolPyruvate carboxylase (PEPc), de la Glycolate Oxydase (GO), de l 'Hydroxypyruvate réductase (HPR) et de la Glutamine synthétase (GS) dosée dans le sens biosynthétique (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles prélevées au 2ème et 3ème flushs de croissance à 380 ou 680 vpm [CO_2]. Toutes les activités sont exprimées en nanokatal.mg^{-1} protéines solubles.

V.2.3. Pourcentage d'activation

Le pourcentage d'activation de la Rubisco ne varie pas significativement entre les deux flushs étudiés, avec en moyenne 61% d'activation sous 380 vpm [CO_2] et 56% sous 680 vpm [CO_2].

L'élévation du [CO_2] atmosphérique entraîne donc une diminution de l'activation de la Rubisco, mais elle n'est significative que pour le flush 3 (-8.5%).

VI. ACTIVITES ENZYMATIQUES AUTRES QUE LA RUBISCO

Les activités des différentes enzymes étudiées sont présentées dans le tableau 10.

VI.1. Activité de la Phospho EnolPyruvate carboxylase

L'activité spécifique de la PEPc est significativement plus basse de près de 40% dans les feuilles du 3ème flush par rapport à celles du second flush.

L'élévation du [CO_2] atmosphérique entraîne une baisse non-significative de l'activité de la PEPc, quel que soit le flush étudié.

VI.2. Activité de la Glycolate Oxydase

L'activité de la Glycolate Oxydase (GO) est plus élevée dans les feuilles du 3ème flush que dans les feuilles du second flush, avec une augmentation significative sous [CO_2] ambiant (+63.7%) mais pas sous [CO_2] élevé (+21.6%).

Pour les feuilles du second flush, l'élévation du [CO_2] atmosphérique n'induit pas de variation significative de l'activité de la GO. Pour les feuilles du troisième flush, par contre, le fort [CO_2] entraîne une diminution significative de 28.2% de l'activité de l'enzyme.

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Saccharose ($mg.cm^{-2}$)	0.39 ± 0.03 c	0.70 ± 0.05 a	0.52 ± 0.03 b	0.40 ± 0.03 c
Saccharose ($mg.g^{-1}$ MS)	5.81 ± 0.48 b	9.14 ± 0.59 a	7.67 ± 0.47 a	5.44 ± 0.42 b

Tableau 11 : Teneurs en saccharose (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles des 2ème et 3ème flushs de croissance à 380 ou 680 vpm [CO_2]. Les concentrations sont exprimées par unité de masse sèche ou de surface foliaire.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

VI.3. Activité de l'HydroxyPyruvate Réductase

L'activité de l'Hydroxypyruvate réductase (HPR) est significativement plus haute dans les feuilles du flush 3 que du flush 2 pour les arbres ayant poussé sous [CO_2] ambiant (+19.5%). La différence entre les flushs sous fort [CO_2] n'est pas significative.

L'activité de la HPR n'est pas modifiée par la concentration atmosphérique en CO_2 dans les feuilles du second flush, tandis qu'elle est significativement diminuée sous fort [CO_2] dans les feuilles du troisième flush (-21.9%).

VI.4. Activité de la Glutamine Synthétase

L'activité de la Glutamine synthétase (GS) est significativement plus haute dans les feuilles du flush 3 que dans les feuilles du flush 2, sachant que la différence est plus sensible sous [CO_2] ambiant (+60.3%) que sous [CO_2] élevé (+29.8%).

La différence entre les activités de l'enzyme lorsque les arbres sont soumis à 380 ou 680 vpm [CO_2] n'est pas significative pour le second flush, mais l'activité de la GS est significativement plus basse sous [CO_2] élevé dans les feuilles du troisième flush.

VII. TENEUR EN SACCHAROSE DANS LES FEUILLES

La teneur en saccharose présente des réponses très différentes en fonction des flushs et du traitement [CO_2] (Tableau 11).

Pour les arbres soumis au [CO_2] ambiant, la concentration en saccharose (exprimée par unité de surface ou de masse foliaire) est significativement plus haute d'environ un tiers dans les feuilles du flush 3 que dans les feuilles du flush 2, tandis que pour les arbres soumis au fort [CO_2], la concentration est à l'inverse significativement plus basse dans les feuilles du troisième flush par rapport au second flush (environ -41%).

	Flush 2		Flush 3	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Rapport Chl.a/Chl.b	4.67 ± 0.16 bc	5.38 ± 0.17 a	4.60 ± 0.13 c	5.03 ± 0.16 ab
Chl.a ($mg.m^{-2}$)	375.65 ± 4.99 c	344.87 ± 4.67 d	477.35 ± 6.29 a	441.57 ± 7.72 b
Chl.b ($mg.m^{-2}$)	99.18 ± 3.71 b	76.13 ± 3.15 c	118.45 ± 3.58 a	102.62 ± 3.46 b
Chl.a+b ($mg.m^{-2}$)	474.82 ± 6.70 c	421.00 ± 5.78 d	595.80 ± 8.08 a	544.19 ± 9.17 b
Carot. ($mg.m^{-2}$)	143.06 ± 1.71 c	130.71 ± 1.52 d	165.11 ± 2.09 a	154.01 ± 2.52 b
Pigments ($mg.m^{-2}$)	617.89 ± 8.19 c	551.71 ± 7.13 d	760.91 ± 10.13 a	698.19 ± 11.63 b
Chl.a ($mg.g^{-1}$ MS)	5.98 ± 0.10 c	4.83 ± 0.11 d	7.14 ± 0.11 a	6.43 ± 0.13 b
Chl.b ($mg.g^{-1}$ MS)	1.49 ± 0.0 b	0.97 ± 0.04 c	1.79 ± 0.06 a	1.50 ± 0.05 b
Chl.a+b ($mg.g^{-1}$ MS)	7.47 ± 0.13 b	5.80 ± 0.12 c	8.93 ± 0.14 a	7.93 ± 0.16 b
Carot. ($mg.g^{-1}$ MS)	2.25 ± 0.03 b	1.79 ± 0.03 c	2.47 ± 0.03 a	2.23 ± 0.04 b
Pigments ($mg.g^{-1}$ MS)	9.72 ± 0.16 b	7.59 ± 0.15 c	11.40 ± 0.18 a	10.16 ± 0.20 b
Pigments ($mg.g^{-1}$ N)			376.73 ± 5.18 a	206.73 ± 7.32 b

Tableau 12 : Teneurs en Chlorophylles a et b et en Caroténoïdes (± erreur standard; *n = 100*) dans les feuilles des 2ème et 3ème flushs de croissance à 380 ou 680 vpm [CO_2]. Les concentrations sont exprimées par unité de masse sèche, de surface foliaire ou par gramme d'azote.

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à $p<0.05$).

L'élévation du [CO_2] atmosphérique a induit une augmentation nette de la teneur en saccharose dans les feuilles du second flush (respectivement +79.5% et +57.3% pour la concentration exprimée par unité de surface et par unité de masse). Par contre, l'inverse est observé dans les feuilles du troisième flush où la teneur en saccharose est plus basse (-23.1% par unité de surface et –29.1% par unité de masse) pour les arbres sous [CO_2] élevé que sous [CO_2] ambiant.

VIII. TENEURS EN PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES

Les différentes concentrations en pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) sont présentées dans le Tableau 12.

Pour l'ensemble des pigments, on observe une augmentation significative de leur concentration dans le troisième flush par rapport au second flush, avec une élévation sensiblement équivalente pour les deux traitements [CO_2] lorsque la concentration est exprimée par unité de surface foliaire (environ +25%), et plus élevée sous fort [CO_2] (+33.9%) que sous [CO_2] ambiant (+17.3%) lorsque la concentration en pigments est exprimée par unité de masse foliaire. Dans le $3^{ème}$ flush, la quantité de pigments rapportée à la quantité d'azote est significativement plus basse (-45.1%) sous 680 vpm [CO_2] que sous 380 vpm.

La teneur en pigments est significativement plus basse sous fort [CO_2] que sous [CO_2] ambiant pour les flushs 2 et 3, avec une baisse respectivement de 10.7 et 8.2% pour les concentrations exprimées par unité de surface, et 21.9 et 10.9% pour les concentrations exprimées par unité de masse.

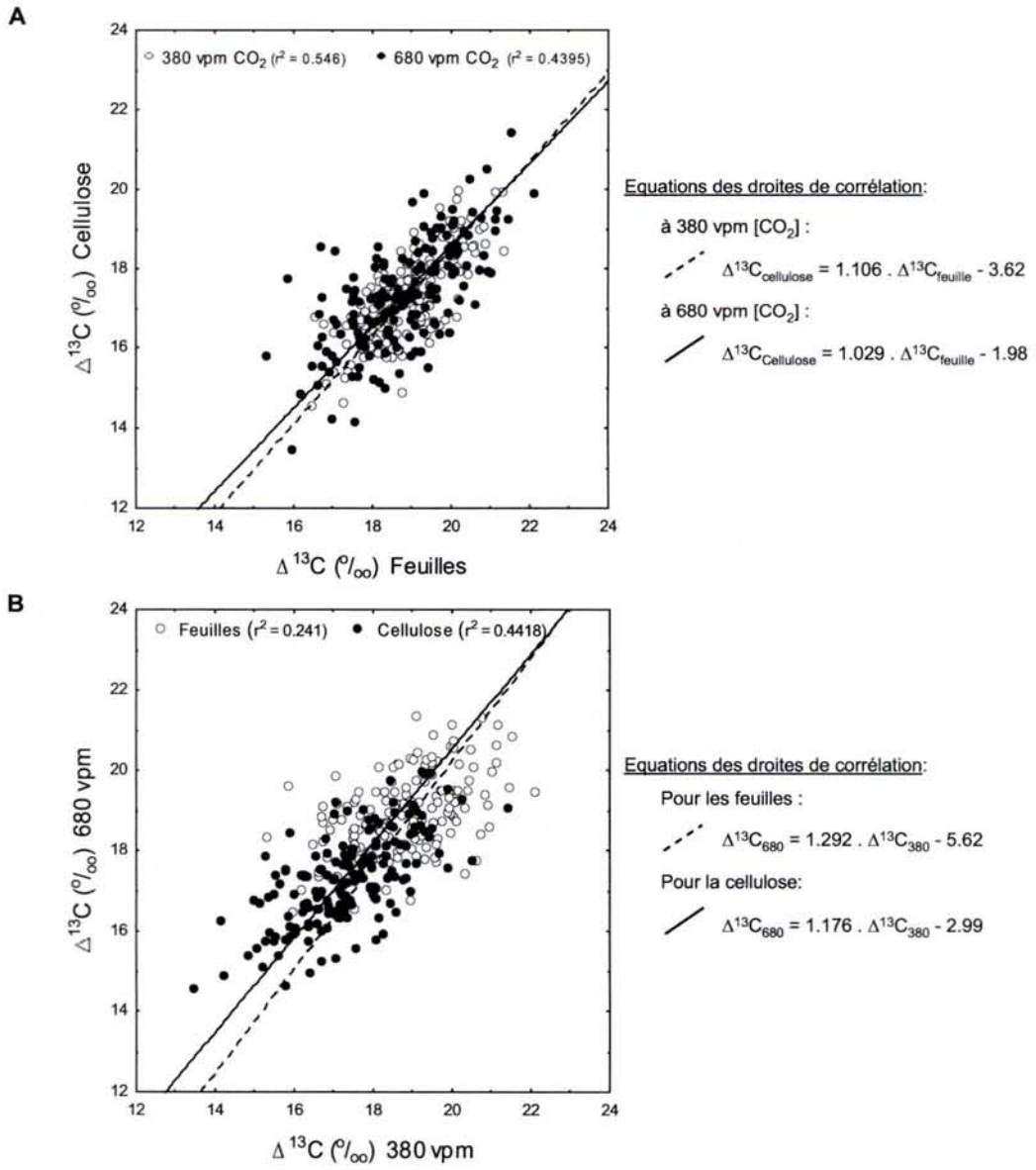
Globalement, les *concentrations en chlorophylle a et en caroténoïdes* évoluent de la même façon, avec des baisses de valeurs comprises entre –6.7 et –8.6% par unité de surface et –9.9 et –20.4% par unité de masse lorsque les arbres sont soumis au fort [CO_2]. La *chlorophylle b* réagit par contre de façon plus sensible à l'élévation du [CO_2], avec une concentration significativement plus basse de –23.2 et –13.4% par unité de surface pour les flush 2 et 3, et de –34.9 et –16.2% par unité de masse.

Le *rapport entre chlorophylle a et chlorophylle b* ne varie pas de façon significative entre les deux flushs, quel que soit le traitement [CO_2]. Par contre, les feuilles des arbres ayant poussé sous [CO_2] élevé ont un rapport Chl.a/Chl.b significativement plus élevé que sous [CO_2] ambiant, de façon plus sensible dans le second flush (+15.2%) que dans le troisième flush (+9.3%).

	Flush 3	
	380 vpm [CO2]	680 vpm [CO2]
$\Delta^{13}C$ feuilles (‰)	18.88 ± 0.08 a	18.77 ± 0.10 a
$\Delta^{13}C$ cellulose (‰)	17.27 ± 0.08 a	17.23 ± 0.14 a

Tableau 13 : Discrimination isotopique contre le ^{13}C (± erreur standard; *n = 183*) mesurée sur des feuilles du 3ème flush ou de la cellulose du bois des chênes pédonculés ayant poussé sous 380 et 680 vpm de [CO_2].

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à p<0.05).



Figures 19 A,B: Corrélations entre A: la discrimination mesurée sur la cellulose du bois par rapport à celle mesurée sur les feuilles du 3ème flush, à 380 et 680 vpm [CO_2]. B: la discrimination mesurée à 680 vpm [CO_2] par rapport à celle mesurée à 380 vpm [CO_2] sur les feuilles du 3ème flush et la cellulose du bois. (n=183)

IX. DISCRIMINATION ISOTOPIQUE CONTRE LE ^{13}C

Les valeurs de discrimination isotopique mesurées sur la cellulose du bois sont significativement plus basses par rapport aux mesures effectuées sur les feuilles entières (Tableau 13). Les mesures effectuées sur l'ensemble des arbres montre une bonne corrélation linéaire entre les valeurs de discrimination des feuilles et celles de la cellulose (Figure 19A). La droite de corrélation présente une pente voisine de 1, indiquant que la différence de discrimination de 1.6 ‰ constatée entre les feuilles et la cellulose du bois est à peu près la même chez tous les individus.

Le traitement CO_2 n'a par contre induit aucune modification significative de la discrimination isotopique contre le ^{13}C, quelque soit l'élément utilisé pour les mesures (Tableau 13). La corrélation entre les valeurs de discrimination des arbres à 380 et 680 vpm [CO_2] est moins nette que dans la comparaison précédente, mais reste significative (r^2 = 0.24 et 0.44 respectivement pour les feuilles et la cellulose) (Figure 19B). Les pentes sont légèrement supérieures à celle de la bissectrice et équivalentes pour les deux échantillons végétaux (pente = 1.29 pour les feuilles et 1.18 pour la cellulose), ce qui signifie que l'élévation du [CO_2] atmosphérique creuse les différences de discrimination entre les génotypes. Les individus qui présentent une faible discrimination contre le ^{13}C sous 380 vpm [CO_2] ont eu une discrimination encore plus faible sous 680 vpm [CO_2], et inversement pour les individus ayant les valeurs de discrimination les plus élevées.

X. EFFICIENCE D'UTILISATION EN EAU (WUE)

X.1. Efficience mesurée à partir des valeurs d'échanges gazeux

L'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque, calculée comme le rapport entre assimilation carbonée et conductance stomatique, est très fortement et significativement stimulée par le [CO_2] élevé (Figure 16). L'écart est le plus faible entre les deux traitements [CO_2] pour le flush 1 (+15.4%), puis augmente nettement en milieu de saison jusqu'à atteindre 99.3% de différence pour le début du flush 3. Cet écart se réduit alors et n'est plus que de 49.1% à t5. Globalement, la hausse moyenne de WUEi sur le troisième flush est de 82.3% pour les arbres soumis au [CO_2] élevé (Tableau 14).

	Flush 3	
	380 vpm [CO2]	680 vpm [CO2]
WUE instantanée moyenne	31.14 ± 0.83 b	56.76 ± 1.43 a
WUE (b fixe = 27 ‰)	84.85 ± 0.79 b	153.49 ± 1.83 a

Tableau 14 : Efficience d 'utilisation en eau (WUE ± erreur standard; *n = 183*) calculée à partir des mesures d 'échanges gazeux effectuées sur le 3ème flush (valeur de WUE instantanée moyenne) ou à partir des mesures de discrimination isotopique foliaire (valeur de WUE intégrée dans le temps).

Les lettres indiquent les différences significatives entre les données des deux dates et des deux concentrations en CO_2 (ANOVA et test-t pour échantillons appariés, probabilité à p<0.05).

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
MS totale	Male	380 vpm	11	46 ± 19.2	2.16	150	43.49	0.078 **	6.2	18.2
			12	22.9 ± 15.9	2.54	89	61.157	0.097 **	12	
MS racines	Male	380 vpm	11	47 ± 23.5	2.48	150	15.03	0.04 ***	7.8	7.8
MS tiges	Male	380 vpm	11	46.5 ± 18.6	2.17	150	23.99	0.137 *	5.7	19.4
			12	18.9 ± 12.3	2.79	89	37.39	0.057 **	13.7	

B

						380 vpm			680 vpm						effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	n	Effet	PEV	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
MS totale	Male	t5	2	44.4 ± 12.2	3.38	149	0.41 *	3.9	148	0.47 *	5.9	0.000 ***	0.000 ***	ns	non
			12	18 ± 9.59	3.25	89	0.72 *	13	87	0.39	4.9	0.015 ***	0.015 ***	ns	non
MS tiges	Female	t5	12	47.4 ± 7.46	3.11	141	-0.45*	5.1	141	-0.43 *	4.9	0.087 **	0.000 ***	ns	non
	Male	t5	2	45.1 ± 16.8	3.09	149	0.41 *	3.9	148	0.42 *	4.7	0.104 *	0.000 ***	ns	non

Tableaux 15A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les biomasses aériennes et racinaires des chênes ayant poussé sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

*La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} : QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

La population se répartit de manière plus lâche sous fort [CO_2] que sous [CO_2] ambiant lorsqu'on la catégorise en fonction des valeurs de WUE intrinsèque, avec des valeurs de WUE_i nettement plus élevées, excepté pour la dernière mesure (t5) où les deux distributions se rapprochent dans leurs valeurs et leur aspect (Figure 17). Les rangs des génotypes ne sont pas ou peu conservés entre les deux traitements [CO_2] au cours du temps (Tableau 4). On peut d'ailleurs signaler que les résultats obtenus dans les deux serres sont faiblement voire ne sont pas corrélés entre eux, en fonction des dates de mesures (Tableau 3).

X.2. Efficience mesurée à partir des valeurs de discrimination isotopique

Calculée à partir des valeurs de discrimination isotopique seules et du coefficient b « standard », la WUE est augmentée de près de 80% sous fort [CO_2] (Tableau 14).

XI. LES QTLs DETECTES PAR CARACTERE

Par souci de simplicité, les QTLs détectés sont présentés en fonction du caractère étudié, et listés en fonction des cartes génétiques et des groupes de liaison (LG). La présentation des QTLs par groupe de liaison sera effectuée dans la partie Discussion du manuscrit.

XI.1. QTLs liés à la biomasse

5 QTLs ont été détectés à partir des valeurs de biomasse mesurées à 380 vpm [CO_2] uniquement, et tous localisés sur des régions précises des LG11 et LG12 de la carte génétique mâle (Tableau 15A). 1 QTL significatif a été trouvé pour la biomasse racinaire sur le LG11 et explique 7.8% de la variance entre génotypes. 2 QTLs putatifs ont été trouvés pour la biomasse totale et 2 autres pour la biomasse de tiges sur les LG 11 et 12 de la carte, pour une variance phénotypique expliquée respectivement de 18.2 et 19.4%.

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Diamètre tronc	Male	380 vpm – t0	12	10.7 ± 7.82	2.2	89	0.97	0.162 +	10.9	10.9
		380 vpm – t5	11	50.3 ± 20.3	2.03	150	1.61	0.186 +	5.8	19.2
			12	16.9 ± 10	2.86	90	2.49	0.029 ***	13.4	
Hauteur tronc	Femelle	380 vpm – t0	12	48.4 ± 5.44	3.3	142	-8.91	0.018 ***	10.2	10.2
		680 vpm – t0	4	18.1 ± 10.1	3.17	144	-8.4	0.016 ***	9.7	9.7

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Diamètre tronc	Male	**t0**	12	12.9 ± 7.55	3.11	90	0.6 *	10.9	10.9	90	0.39	5.3	5.3	0.057 **	0.029 ***	ns	non
		t5	12	15.9 ± 9.4	3.36	90	0.72*	13.8	13.8	88	0.26	2.3	2.3	0.043 ***	0.057 **	0.02 ***	**oui**
Hauteur tronc	Female	**t0**	4	21.3 ± 10.7	4.16	145	-0.36 *	3.4	12.7	144	-0.55*	9	10.5	0.144 *	0.000 ***	ns	non
			12	48.8 ± 4.64	3.54	142	-0.58 *	9.3		141	-0.24	1.5		0.087 **	0.000 ***	ns	non

<u>Tableaux 16A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour le diamètre des troncs au collet et la hauteur initiale (t0) et finale (t5) des chênes ayant poussé sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\boldsymbol{p_{gen}}$ *:* *QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

4 QTLs ont été détectés par l'analyse multi-environnementale sur les deux concentrations en CO_2 (Tableau 15B), avec 2 QTLs significatifs pour la masse sèche finale totale sur les LG2 et LG12 de la carte mâle, expliquant 16.9 et 10.8 % de la variabilité phénotypique respectivement à 380 et 680 vpm [CO_2]. Les effets des deux QTLs sur la biomasse totale sont relativement proches, et ne sont pas significativement modifiés par l'élévation du [CO_2]. Les 2 QTLs restants sont lié à la biomasse des tiges, et sont localisés sur le LG12 de la carte femelle et le LG2 de la carte mâle. Aucun ne présente de réponse significative au fort [CO_2].

XI.2. QTLs liés à la croissance

Les QTLs ont toujours été détectés pour les valeurs initiales ou finales de diamètre ou hauteur du tronc (Tableaux 16), mais pas pour les pourcentages de croissances en eux mêmes.

3 QTLs à effets positifs ont été détectés (Tableau 16A) pour le diamètre du tronc mesuré à 380 vpm [CO_2] uniquement sur la carte mâle, avec 1 QTL putatif lié aux valeurs finales de diamètre sur le LG11, et 2 QTLs relativement proches (environ 6 cM) pour le diamètre initial et final du tronc sur le LG12 et avec des variances expliquées similaires (10.9 et 13.4%), seul le deuxième étant significatif.

L'analyse multi-environnementale a retrouvé ces 2 derniers QTLs sur le LG12 de la carte mâle, corrélés au diamètre initial et final du tronc, seul le deuxième étant significatif au niveau du génome (Tableau 16B). Les variances expliquées sont similaires à celles des QTLs « simples » précédemment cités, mais on voit ici que l'effet du QTL sur le diamètre diminue significativement de près de 64% après que les arbres aient été soumis au [CO_2] élevé.

2 QTLs significatifs ont été détectés pour la hauteur initiale du tronc sur la carte génétique femelle (Tableau 16A), sur le LG12 pour les données obtenues à 380 vpm [CO_2] et le LG4 pour celles de 680 vpm [CO_2]. Les deux QTLs ont des effets et des variances expliquées très similaires sur le phénotype des arbres.

Ces deux QTLs ont été trouvés également par l'analyse multi-environnementale toujours pour les données initiale uniquement de la hauteur du tronc, mais ne sont pas significatifs (Tableau 16B). L'effet négatif des deux QTLs ne présente pas de réponse significative au fort [CO_2], et les variances totales expliquées sont assez proches, même si dans le détail la variance de hauteur expliquée sous 380 vpm [CO_2] est surtout liée au QTL sur le LG4 et celle de 680 vpm [CO_2] par le LG12.

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	pgen	PEV	PEV cumulé
% eau foliaire	Femelle	680 vpm - t5	11	17.5 ± 4	4.31	147	-1.56	0.012 ***	12.5	12.5
	Male	380 vpm - t5	9	21.3 ± 18.3	2.73	132	1.35	0.024 ***	9.8	9.8
		680 vpm - F2	2	67.5 ± 15.3	2.14	127	2.21	0.121 *	7	22.8
			11	61.9 ± 6.41	5.85	154	-3.29	0.000 ***	15.8	

Tableau 17: QTLs détectés par CIM (Composite Interval Mapping) pour le pourcentage en eau des feuilles développées sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]).

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} : *QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
SLA	Femelle	380 vpm – t5	2	51.6 ± 13	2.58	164	14.9	0.036 ***	8	8
	Male	380 vpm – F2	8	58 ± 12	3.08	122	15.21	0.000 ***	9.2	21.1
			11	33.1 ± 20.8	4.68	133	-17.33	0.000 ***	11.9	
		680 vpm – F2	11	57.8 ± 5.99	5.15	153	-21.04	0.000 ***	15.6	15.6
		680 vpm – t5	3	46.8 ± 9.55	2.3	133	-16.81	0.111 *	8	8

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
SLA	Female	**t5**	2	52 ± 13.3	2.92	164	14.88 *	7.9	7.9	162	3.6	0.4	0.4	0.115 *	0.088 **	ns	non
	Male	**F2**	11	56 ± 7.55	9.49	153	-15.82 *	11.1	11.1	153	-21.19 *	14.8	14.8	0.000 ***	0.000 ***	ns	non
		t5	3	43.6 ± 13.5	2.84	159	-1.38	1.3	1.3	157	-3.42 *	8.5	8.5	0.029 ***	0.432	0.012 ***	**oui**

Tableaux 18A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour la surface foliaire spécifique SLA mesurée dans le flush 2 (F2) et le flush 3 (t5) des chênes ayant poussé sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} *: QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

XI.3. QTLs liés aux caractéristiques foliaires

4 QTLs simples ont été détectés pour le pourcentage en eau foliaire (Tableau 17). 1 QTL significatif à effet négatif sur le phénotype a été localisé sur le LG11 de la carte femelle, lié aux mesures effectuées en fin de saison (t5) et sous 680 vpm [CO_2], et expliquant 12.5% de la variation entre génotypes. Les 3 autres QTLs sont localisés sur la carte génétique mâle, un QTL significatif à effet positif sur le LG9 et lié aux valeurs mesurées à t5 sous [CO_2] ambiant et expliquant 9.8% de la variabilité, et deux QTLs liés aux mesures réalisées sur le second flush sous [CO_2] élevé et localisés sur les LG2 et LG11. Seul le deuxième est significatif et il explique 15.8 % de la variabilité phénotypique et possède un effet négatif sur la teneur en eau foliaire.

XI.3.1. QTLs liés à la surface foliaire spécifique

5 QTLs ont été détectés pour la surface foliaire spécifique (SLA) dans les feuilles de chêne (Tableau 18A), dont 4 sont significatifs. 1 seul QTL significatif a été localisé sur le LG2 de la carte génétique femelle pour la SLA mesurée à 380 vpm [CO_2] sur le flush 3 (t5), et expliquant 8% de la variance phénotypique. Parmi les 4 autres QTLs situés sur la carte mâle, 2 QTLs significatifs ont été détectés pour les mesures sur le Flush 2 à 380 vpm [CO_2] sur les LG8 et LG11 (à 33cM du haut du QTL) avec des effets opposés (positif pour le LG8 et négatif pour le LG11), et expliquant à eux deux 21.1% de la variance phénotypique observée. 1 QTL significatif à effet négatif a été détecté sur le LG11 (à 58 cM du haut du LG) pour les mesures de SLA du Flush 2 sous [CO_2] élevé, pour un PEV de 15.6%. Le dernier QTL détecté pour les mesures effectuées sur le flush 3 à [CO_2] élevé est localisé sur le LG3 de la carte mâle, mais n'est pas significatif.

L'analyse multi-environnementale a permis de confirmer 3 des QTLs présents (Tableau 18B), 1 QTL sur le LG2 de la carte femelle pour les mesures du flush 3 mais qui n'est pas significatif, et 2 QTLs significatifs sur la carte mâle correspondant aux mesures de SLA effectuées sur le flush 2 (LG11, à 56 cM du haut du groupe de liaison) et le flush 3 (LG3). Ces deux QTLs ont des effets négatifs sur le phénotype, effets accentués sous fort [CO_2] par rapport au [CO_2] ambiant. Le QTL situé sur le LG3 répond d'ailleurs de manière significative à l'élévation du [CO_2], et le pourcentage de variance expliquée par ce QTL est supérieure sous fort [CO_2] (8.5%) par rapport au [CO_2] ambiant (1.3%).

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
N (%)	Femelle	380 vpm - t5	2	34.6 ± 20.8	2.23	142	0.26	0.184 +	7	7
	Male	380 vpm - t5	1	19.4 ± 11.3	3.27	128	0.39	0.036 ***	15.8	15.8
N ($g.m^{-2}$)	Femelle	380 vpm - t5	11	21.4 ± 11.2	3.96	145	-1.1	0.000 ***	11.7	11.7
		680 vpm - t5	5	52.1 ± 27	2.59	128	1.58	0.051 **	11.5	11.5
	Male	380 vpm - t5	8	40.6 ± 18.3	2.2	134	1.2	0.09 **	7.6	7.6
		680 vpm - t5	8	61.5 ± 13	3.68	125	1.66	0.01 ***	12.3	18.3
			9	39.2 ± 18.5	2.27	144	-1.1	0.093 **	6	
N ($g.g^{-1}$ MS)	Femelle	380 vpm - t5	2	34.7 ± 21.5	2.23	142	0.26	0.145 *	7	7
	Male	380 vpm - t5	1	19.7 ± 11.4	3.27	128	0.39	0.018 ***	15.8	15.8
		680 vpm - t5	3	45.2 ± 8.75	3.3	132	-0.39	0.000 ***	12	18.2
			9	42.7 ± 13.9	2.21	149	-0.27	0.115 *	6.2	

B

						380 vpm				680 vpm				
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}
N ($g.m^{-2}$)	Female	t5	5	52.5 ± 26.4	2.8	138	0.104	0.3	11.8	128	0.67 *	12	13.5	0.0995 **
			11	22 ± 11.1	4.4	138	-0.61 *	11.5		139	-0.23	1.5		0.0121 ***
	Male	t5	8	48.5 ± 16.8	4.26	134	0.51 *	7.8	7.8	129	0.54 *	7.9	7.9	0.0509 **
N ($g.g^{-1}$ MS)	Male	t5	1	20.6 ± 8.93	4.41	128	0.703 *	14.6	14.7	125	0.42	4.8	17.2	0.0181 ***
			3	43.6 ± 8.6	3.44	136	0.042	0.1		132	-0.71 *	12.4		0.0975 **

Tableaux 19A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour la teneur en azote foliaire mesurée sur le flush 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

*La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} : QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

XI.3.2. QTLs liés à l'azote foliaire

Les QTLs détectés à partir des mesures d'azote foliaire sur le 3ème flush sont assez nombreux et ne donnent pas forcément les mêmes résultats selon les modes d'expression de la concentration en azote (Tableaux 19).

2 QTLs sont détectés pour le pourcentage d'azote dans les feuilles sous 380 vpm [CO_2] (Tableau 19A), 1 QTL putatif sur le LG2 de la carte femelle, et 1 QTL significatif à effet positif sur le LG1 de la carte mâle, expliquant 15.8% de la variabilité phénotypique. Aucun QTL équivalent n'a été trouvé par analyse multi-environnementale (Tableau 19B).

5 QTLs ont été trouvés pour l'azote exprimé par unité de surface (Tableau 19A). 2 QTLs sont localisés sur les LG 5 et LG11 de la carte femelle, respectivement corrélés aux valeurs obtenues sous 680 et 380 vpm [CO_2], et dont seul le premier est significatif au niveau du génome et explique 11.7% de la variabilité. Des 3 autres QTLs localisés sur la carte mâle, deux sont situés sur le LG8 et sont liés aux mesures à 380 et 680 vpm [CO_2] (mais seul le second est significatif), et un QTL relié aux mesures à 680 vpm [CO_2] est situé sur le LG9 mais n'est pas significatif.

Les deux QTLs détectés sur les LG5 et LG11 de la carte femelle sont confirmés par les analyses multi-environnementales (Tableau 19B), seul le deuxième étant significatif au niveau du génome, et avec une stimulation de l'effet positif du premier et une réduction de l'effet négatif du deuxième par le [CO_2] élevé.

4 QTLs ont été détectés pour l'azote exprimé par unité de masse foliaire (Tableau 19A). 1 QTL non significatif a été trouvé sur le LG2 de la carte femelle pour les données obtenues à 380 vpm [CO_2]. 1 QTL significatif a été localisé sur le LG1 de la carte male pour l'azote mesuré à 380 vpm [CO_2], dont l'effet positif et qui explique 15.8% de la variance phénotypique. Enfin, les 2 derniers QTLs ont été détectés pour les valeurs d'azote sous 680 vpm [CO_2] sur les LG3 et 9 de la carte mâle et possèdent un effet négatif sur le phénotype, mais seul le premier QTL est significatif au niveau du génome. Par analyse multi-environnementale, seuls les QTLs détectés sur les LG1 et LG3 de la carte mâle ont été retrouvés, mais seul celui situé sur le LG1 est significatif, avec un effet réduit sous fort [CO_2] par rapport au [CO_2] ambiant, et une variance expliquée nettement réduite (-67% de réduction).

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
$\Delta^{13}C$ Feuilles	Femelle	380 vpm – t5	2	40.2 ± 20.6	2.00	149	0.52	0.176 +	6	6
		680 vpm – t5	9	27.7 ± 25.1	2.44	136	0.82	0.082 **	8.4	8.4
	Male	380 vpm – t5	2	71.2 ± 34.2	1.95	119	-0.51	0.168 +	6.1	23.4
			11	66.6 ± 7.44	6.81	154	0.88	0.000 ***	17.3	
		680 vpm – t5	2	62.8 ± 27.5	2.18	125	-0.72	0.000 ***	6.7	28.8
			8	25.4 ± 19.5	2.99	127	-0.86	0.021 ***	10	
			11	61.7 ± 16.3	5.27	153	0.93	0.000 ***	12.1	
$\Delta^{13}C$ Cellulose	Femelle	380 vpm – t5	2	26.7 ± 21.6	2.19	142	0.59	0.161 +	6.2	20.3
			4	93.7 ± 10.9	4.43	142	-0.82	0.000 ***	14.1	
		680 vpm – t5	9	49.4 ± 27.3	2.18	157	0.64	0.158 +	5.5	5.5
	Male	380 vpm – t5	11	55.8 ± 5.12	9.53	161	1.14	0.000 ***	24.1	24.1
		680 vpm – t5	11	48.7 ± 22.9	4.46	165	0.92	0.000 ***	12	12

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
$\Delta^{13}C$ Feuilles	Male	**t5**	2	62.8 ± 33.7	3.58	129	-0.32 *	2.2	28.7	125	-0.67*	6.2	33	0.027 ***	0.045 ***	ns	non
			8	13.1 ± 16.1	6.52	127	-0.52 *	5.8		123	-0.81*	9.3		0.001 ***	0.000 ***	ns	non
			11	66.9 ± 8.77	11.17	136	1.003*	20.7		135	1.1*	17.5		0.000 ***	0.000 ***	ns	non
$\Delta^{13}C$ Cellulose	Female	**t5**	2	22.6 ± 18.5	3.49	142	0.35*	6.3	26.5	145	0.26*	3	20.7	0.088 **	0.012 ***	ns	non
			4	94 ± 9	9.13	142	-0.51*	15.6		146	-0.52 *	12.7		0.000 ***	0.004 ***	ns	non
			9	59.2 ± 22.1	4	153	0.3	4.6		157	0.34*	5		0.048 ***	0.006 ***	ns	non
	Male	**t5**	11	54.8 ± 6.41	13.44	161	0.65	22.3	22.3	165	0.49	11.2	11.2	0.000 ***	0.000 ***	ns	non

<u>Tableaux 20A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour la discrimination isotopique contre le ^{13}C mesurée sur les feuilles du flush 3 (t5) ou la cellulose du bois sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} : *QTL significatif : *** à $p<0.05$*

*QTL putatif : ** à $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.5$, + $0.15<p<0.2$.*

XI.4. QTLs liés à la discrimination isotopique contre le ^{13}C

7 QTLs ont été détectés pour la discrimination isotopique contre le ^{13}C mesurée sur les feuilles du flush 3 (Tableau 20A). Les 2 QTLs trouvés sur les LG2 et LG9 de la carte génétique femelle respectivement pour les mesures à 380 et 680 vpm [CO_2] ne sont pas significatifs. Par contre, parmi les 5 QTLs trouvés sur la carte génétique mâle, 2 ont été trouvés sur le LG2 et correspondent aux mesures à 380 et 680 vpm [CO_2], possèdent un effet négatif similaire et expliquent tous deux entre 6 et 7% de la variance phénotypique, mais seul le QTL lié aux valeurs de 680 vpm est significatif. 1 QTL significatif a été détecté sur le LG8 pour les mesures réalisées à 680 vpm [CO_2], et 2 QTLs significatifs très proches ont été détectés sur le LG11 pour les deux traitements [CO_2], avec une variance expliquée supérieure de près de 50% pour celui obtenu sous 380 vpm [CO_2] par rapport à 680 vpm [CO_2].

Les analyses multi-environnementales réalisées sur les données de discrimination foliaire ont confirmé la présence de 3 QTLs significatifs sur les LG2, LG8 et LG11 de la carte mâle uniquement (Tableau 20B), expliquant 33% de la variance phénotypique et non touchés par l'élévation du [CO_2] atmosphérique.

5 QTLs ont été détectés à partir des valeurs de discrimination réalisées sur la cellulose du bois (Tableau 20A). 3 de ces QTLs sont localisés sur les LG 2, LG4 et LG9 de la carte femelle, et seul le second, obtenu pour les valeurs de discrimination sous 380 vpm [CO_2], est significatif et explique près de 14% de la variance observée entre les génotypes. Les 2 QTLs localisés sur la carte mâle sont tous les deux significatifs et sont situés sur une même portion du LG11. Ils sont reliés à la discrimination mesurée à 380 et 680 vpm [CO_2], et expliquent respectivement 24 et 12% de la variance de discrimination observée.

L'ensemble de ces QTLs a été retrouvé après analyse multi-environnementale (Tableau 20B), à savoir 3 QTLs ont été détectés sur les LG2, LG4 et LG9 de la carte femelle, les deux derniers étant significatifs et expliquant un peu plus de 20% de la variance phénotypique, et 1 QTL a été détecté sur le LG11 de la carte mâle, sans modification de l'effet par le traitement [CO_2], mais avec une variance expliquée divisée par 2 sous [CO_2] élevé.

A	Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci 1 (cM)	Loci 2 (cM)	LOD	n	Effet 1	Effet 2	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
	A_n	Femelle	380 vpm – t4	9	48.5 ± 13.2		2.6	102	3.41		0.115 *	11	11
			680 vpm - Moy	4	81.4 ± 34.3		2.17	148	1.24		0.186 +	6.2	27.7
				11	41.5 ± 12.7	64.7 ± 10.2	3.31	137	-2.23	2.734	0.104 *	13.1	
				12	36.8 ± 14.2		2.71	141	-1.56		0.087 **	8.4	
			680 vpm – Moy F3	4	90.5 ± 28		2.15	126	1.55		0.108 *	7.3	7.3
		Male	380 vpm – t3	9	0.89 ± 5.83		4.37	134	-3.35		0.000 ***	13.3	25.5
				12	9.63 ± 11.8		2.36	85	3.12		0.124 *	12.2	
			680 vpm – t3	5	52.5 ± 20.7		2.56	140	-3.12		0.109 *	9.5	19.5
				6	19.3 ± 7.84		3.49	136	3.29		0.000 ***	10	

B							380 vpm				680 vpm							effet
	Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
	A_n (norm.)	Female	t5	7	83 ± 24.1	2.89	93	-0.55*	7.9	7.9	99	-0.45	5.5	5.5	0.071 **	0.115 *	ns	non
		Male	t3	9	2.44 ± 9.62	3.59	134	-0.68*	11.4	11.4	131	0.06	0.1	0.1	0.024 ***	0.115 *	0.006 ***	oui
				12	9.4 ± 13.7	2.59	85	0.71*	13	13	85	0.09	0.2	0.2	0.136 *	0.266	ns	non

Tableaux 21A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour l 'assimilation carbonée nette A_n mesurée sur les feuilles de chêne sous 380 ou 680 vpm $[CO_2]$**.** Les mesures d 'assimilation ont été effectuées sur le flush 1 (t1), le flush 2 (t2) et le flush 3 (t3 à t5) dans les serres.

A	Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci 1 (cM)	Loci 2 (cM)	LOD	n	Effet 1	Effet 2	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
	g_s	Femelle	380 vpm – t1	5	78.1 ± 18.7		2.57	151	6.2		0.041 ***	8.3	18
				7	36.1 ± 10.6	74 ± 6.09	3.56	114	7.61	-7.03	0.115 *	9.7	
			380 vpm – t2	3	1.89 ± 3.53	31.5 ± 1.05	3.02	96	10.91	-11.68	0.048 ***	13.5	20.1
				7	46.1 ± 20.2		2.08	139	7.37		0.158 +	6.6	
			680 vpm – t1	11	43.3 ± 9.52		2.37	146	5.58		0.137 *	6.5	6.5
			680 vpm – t3	12	30.6 ± 21.7		2.1	133	-4.74		0.104 *	6.4	6.4
		Male	380 vpm – t2	6	21.3 ± 9.55		2	144	7.01		0.198 +	6.5	6.5
			380 vpm – t3	9	5.86 ± 14.3		2.21	133	-9.98		0.115 *	7.4	7.4
			680 vpm – t1	9	70.9 ± 9.15		2.84	146	6.29		0.104 *	8.9	8.9
			680 vpm – t4	8	63.3 ± 17.5		3.64	123	-9.12		0.000 ***	12.6	19.9
				10	66.3 ± 17.5		2.3	128	-6.9		0.093 **	7.3	
			380 vpm – Ave F3	6	4.36 ± 10.8		2.38	107	6.14		0.111 *	9.4	21.6
				10	37.4 ± 10.8		3.51	122	-7.58		0.012 ***	12.2	
			680 vpm – Ave F3	8	57.9 ± 21.8		2.66	107	-5.31		0.061 **	13	13

B							380 vpm				680 vpm							effet
	Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
	g_s (norm.)	Female	t1	11	45 ± 10.5	2.8	147	0.06	0.1	0.1	146	0.61*	8.8	8.8	0.158 +	0.436	0.025 ***	oui
			t2	7	39.3 ± 16.6	2.57	139	0.53*	6.6	6.6	138	0.32	2.5	2.5	0.115 *	0.147 *	ns	non
		Male	t4	8	63 ± 17.7	3.1	131	-0.18	0.8	2.9	123	-0.63*	10.4	17.5	0.09 **	0.01 ***	ns	non
				10	61.5 ± 19.4	2.84	132	-0.28	2.1		128	-0.52*	7.1		0.178 +	0.093 **	ns	non
			AveF3	8	58.4 ± 19.1	3.58	108	-0.26	1.9	10.5	107	-0.773*	15.2	19.6	0.015 ***	0.015 ***	ns	non
				10	56.9 ± 21.5	3.37	108	-0.56*	8.6		112	-0.4	4.4		0.053 **	0.027 ***	ns	non

Tableaux 22A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour la conductance stomatique à la vapeur d 'eau g_s mesurée sur les feuilles de chêne sous 380 ou 680 vpm $[CO_2]$**.** Les mesures de conductance ont été effectuées sur le flush 1 (t1), le flush 2 (t2) et le flush 3 (t3 à t5) dans les serres.

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ($[CO_2]$), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements $[CO_2]$ ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} *: QTL significatif :* *** *à* $p<0.05$

QTL putatif : ** *à* $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.5$, + $0.15<p<0.2$.

XI.5. QTLs liés à l'assimilation carbonée nette

Aucun QTL n'a été détecté pour l'assimilation carbonée mesurées sur les flushs 1 (t1) et 2 (t2).

9 QTLs ont été détectés pour l'assimilation carbonée (Tableau 21A), dont 5 QTLs non significatifs sur les LG 4, 9, 11 et 12 de la carte femelle, et 4 QTLs sur les LG 5,6, 9 et 12 de la carte mâle – seuls les QTLs détectés sur le LG 6 (pour l'assimilation moyenne sur le flush 3 soumis à 680 vpm [CO_2]) et le LG 9 (pour l'assimilation mesurée à t3 sous 380 vpm [CO_2]) sont significatifs.

3 QTLs ont été trouvés via l'analyse multi-environnementale (Tableau 21B), 1 QTL non significatif pour l'assimilation mesurée à t5 sur le LG7 de la carte femelle, et 2 QTLs pour l'assimilation mesurée à 3 sur le LG9 (significatif) et le LG12 (non significatif) de la carte mâle.

XI.6. QTLs liés à la conductance stomatique à la vapeur d'eau

16 QTLs ont été détectés pour les données de conductance à la vapeur d'eau (Tableau 22A). 8 sont localisés sur les LG3, LG5, LG7, LG11 et LG12 de la carte génétique femelle, et 3 d'entre eux seulement sont significatifs. Parmi ces derniers, 1 QTL est localisé sur le LG5 et est lié à la conductance mesurée sur le flush 1 (t1) sous 380 vpm [CO_2], et les deux autres sont liés sur le LG3 et déterminent 13.5% de la variation de conductance entre génotypes sur le flush 2 à 380 vpm [CO_2]. Parmi les 8 autres QTLs détectés pour la conductance et localisés sur la carte génétique mâle, 2 sont significatifs et se trouvent sur le LG 6 (valeur de conductance moyenne mesurée sur le flush 3 à 380 vpm [CO_2]) et le LG 8 (conductance mesurée à t4 sous 680 vpm [CO_2]).

L'analyse multi-environnementale a permis de trouver 6 QTLs (Tableau 22B), dont 2 QTLs non significatifs sur les LG 7 et 11 de la carte femelle, et 4 QTLs sur les LG 8 et 10 de la carte mâle. Un seul de ces derniers est significatif et est situé sur le LG8. Il est corrélé à la conductance moyenne mesurée sur le flush 3, et son effet n'est pas modifié par le traitement [CO_2]. Toutefois, la variance expliquée par ce QTL est plus élevée sous fort [CO_2] (15.2%) que sous [CO_2] ambiant (10.5%).

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
A_n/g_s	Femelle	380 vpm - t1	10	11 ± 10.6	2.64	142	-9.26	0.036 ***	8.3	8.3
		680 vpm - t1	11	44.1 ± 8.13	2.46	147	-14.1	0.126 *	8.9	8.9
		380 vpm - t2	7	75 ± 24.2	2.01	96	-9.9	0.168 +	8.8	8.8
		680 vpm - t3	1	45.6 ± 16.9	2.16	143	-17.07	0.126 *	6.3	6.3
	Male	380 vpm – t2	6	25.6 ± 9.62	2.38	144	-10.04	0.136 *	7.6	14
			11	43.3 ± 22.5	2.18	141	9.15	0.137 *	6.4	
		380 vpm – t3	4	13.7 ± 15.3	2.11	148	-7.46	0.188 +	6.4	6.4
		380 vpm – Ave	8	44.6 ± 26.5	2.06	143	5.05	0.173 +	7	7
		680 vpm – Ave F3	10	34.4 ± 10.3	2.15	114	9.07	0.178 +	7.3	7.3

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
WUE = A_n/g_s (norm.)	Female	t3	9	51.7 ± 15.9	2.74	104	-0.37	3.5	3.5	103	-0.57*	8	8	0.147 *	0.283	ns	non
WUE	Female	t5	2	21.4 ± 18.1	3.04	142	-5.09*	4.5	10.5	145	-14.18	3.8	11.8	0.071 **	0.079 **	ns	non
= f ($\Delta^{13}C$ Cellulose)			9	30.5 ± 29.1	3.53	141	-2.73	1.3		145	-14.16*	3.9		0.048 ***	0.093 **	0.007 ***	oui
			11	15.7 ± 10.8	3.24	153	5.33 *	4.7		157	14.29 *	4.1		0.071 **	0.036 ***	ns	non
	Male	t5	4	65.1 ± 21.1	3.26	109	-6.03 *	6.3	27.8	113	-17.21	5	8.1	0.024 ***	0.048 ***	0.014 ***	oui
			11	54.8 ± 10.6	10.33	161	-11.07 *	21.5		165	-13.31 *	3.1	3.1	0.000 ***	0.000 ***	ns	non
WUE	Female	t5	9	52.6 ± 25.1	3.67	150	-4.53	4.6	4.6	147	-11.77 *	6	6	0.012 ***	0.017 ***	ns	non
= f ($\Delta^{13}C$ Feuilles)	Male	t5	8	12.7 ± 17.5	5.4	127	4.7 *	4.4	20.8	123	15.59*	11	21.2	0.000 ***	0.000 ***	0.009 ***	oui
			11	66.8 ± 7.05	11.51	154	-9.12 *	16.4		151	-14.71 *	10.2		0.000 ***	0.000 ***	ns	non

<u>Tableaux 23A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour l 'efficience d 'utilisation de l 'eau WUE calculée A. à partir des valeurs d 'échanges gazeux sur les feuilles de chêne sous 380 ou 680 vpm [CO_2] (mesures effectuées sur le flush 1 (t1), le flush 2 (t2) et le flush 3 (t3 à t5) dans les serres). **B. à partir des mesures de discrimination isotopique contre le ^{13}C obtenues à partir des feuilles du 3ème flush ou de la cellulose du bois (coeff. B standard).**

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$ *: QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

XI.7. QTLs liés à l'efficience d'utilisation de l'eau WUE

Parmis les 9 QTLs détectés à partir des valeurs de WUE obtenues des échanges gazeux (rapport A/g), 4 QTLs sur les LG1, LG4, LG10 et LG11 de la carte femelle et 5 QTLs sur les LG4, LG8, LG6, LG10 et LG11 de la carte mâle, seul 1 QTL détecté pour l'efficience à 380 vpm $[CO_2]$ à t1 sur le LG10 de la carte femelle est significatif (Tableau 23A).

L'analyse multi-environnementale donne uniquement 1 QTL non significatif pour le rapport A/g, lié aux mesures à t3 et localisé sur le LG9 de la carte femelle (Tableau 23B).

Les QTLs liés aux valeurs de WUE liés à la discrimination n'ont pas été testés par une analyse simple, mais ont été recherchés par analyse multi-environnementale (Tableau 23B). Cette analyse a donné 8 QTLs liés à l'efficience d'utilisation de l'eau, 5 QTLs à partir des mesures de discrimination sur la cellulose et 3 QTLs pour les feuilles.

Pour l'efficience mesurée à partir de la *discrimination de la cellulose*, 3 QTLs ont été détectés sur les LG2, LG9 et LG11 de la carte femelle, et seul le QTL du LG9 est significatif au niveau du génome et présente un effet négatif sur la WUE significativement accentué sous fort $[CO_2]$. Les 2 QTLs détectés sur les LG 4 et LG11 de la carte mâle sont significatifs et sont liés aux valeurs obtenues à t5. Leurs effets négatifs sont modifiés sous $[CO_2]$ élevé, mais seul le premier l'est de manière significative (l'effet devient non significatif sous fort $[CO_2]$). Le PEV est à l'inverse diminué fortement sous $[CO_2]$ élevé (8.1%) par rapport au $[CO_2]$ ambiant (27.8%).

Pour l'efficience mesurée à partir de la *discrimination des feuilles*, les 3 QTLs détectés sont significatifs. 1 se situe sur le LG9 de la carte génétique femelle et n'est pas significativement modifié par le traitement $[CO_2]$. Les deux autres QTLs sont localisés sur les LG8 (effet positif) et LG11 (effet négatif) de la carte mâle et expliquent à eux deux environ 21% de la variabilité phénotypique observée quel que soit le $[CO_2]$. Seul l'effet du QTL situé sur le LG8 présente une réponse significative au fort $[CO_2]$ et est triplé par rapport au $[CO_2]$ ambiant.

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Protéines solubles ($g.m^{-2}$)	Male	680 vpm - F2	1	35.2 ± 7.39	4.19	44	0.57	0.000 ***	32.1	50.5
			5	88 ± 19.7	2.25	54	0.43	0.146 *	18.4	
		380 vpm - t5	7	5.46 ± 12.1	2.30	87	-2.22	0.12 *	11.4	11.4
Protéines solubles ($mg.g^{-1}$ MS)	Femelle	380 vpm - t5	8	43.4 ± 16.7	2.22	71	38.13	0.124 *	15.8	15.8
Protéines totales ($g.m^{-2}$)	Femelle	680 vpm - F2	9	44.6 ± 13.6	2.60	81	1.3	0.000 ***	12.4	12.4
		380 vpm - t5	1	58.1 ± 7.54	3.04	81	1.28	0.000 ***	14.6	14.6
	Male	380 vpm - F2	2	43 ± 20.1	2.57	87	-1.09	0.045 ***	11.6	26.1
			4	79 ± 14.8	2.44	57	-1.22	0.000 ***	14.5	
		680 vpm - F2	11	84.1 ± 14.9	3.10	79	1.57	0.000 ***	16.7	16.7
		680 vpm - t5	8	33.1 ± 21.9	2.43	78	1.21	0.000 ***	10.6	30.1
			12	12.8 ± 7.03	2.92	44	-1.64	0.071 *	19.5	
Protéines totales ($mg.g^{-1}$ MS)	Femelle	380 vpm - F2	5	70.9 ± 18.1	2.09	78	17.57	0.146 *	10.4	21.1
			10	52 ± 21.3	2.16	91	-17.89	0.088 **	10.7	
		680 vpm - F2	2	20.2 ± 19.3	2.21	65	-21.27	0.045 ***	11.1	40.8
			6	26.1 ± 11.3	3.96	65	-23.72	0.000 ***	13.8	
			8	19.1 ± 4.5	3.89	68	25.44	0.071 **	15.9	
		680 vpm - t5	12	4.13 ± 8.87	2.39	68	20.21	0.087 **	15.3	15.3
	Male	380 vpm - F2	11	19.3 ± 14.7	3.66	75	-23.21	0.000 ***	15.1	40.4
			12	9.19 ± 10.1	3.01	41	29.99	0.000 ***	25.3	
Protéines totales ($g.g^{-1}$ N)	Femelle	380 vpm - t5	11	42.9 ± 9.08	2.16	80	0.46	0.168 +	10.5	• 10.5

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Protéines totales ($g.m^{-2}$)	Male	**F2**	4	79.3 ± 14	3.03	57	-1.321*	16.1	16.1	56	0.424	1.2	1.2	0.059 **	0.130	ns	non
		t5	5	56.8 ± 27.2	2.59	58	0.925 *	6.6	16.7	60	0.839	4.9	12.2	0.051 **	0.005 ***	ns	non
			8	34 ± 15.7	3.41	76	1.14 *	10.1		78	1.025 *	7.3		0.000 ***	0.003 ***	ns	non
Protéines totales ($mg.g^{-1}$ MS)	Femelle	**F2**	2	42.4 ± 16.2	3.12	85	4.78	0.8	14.6	77	-20.102 *	12.4	27	0.088 **	0.156	-	non
			5	67.8 ± 14.4	3.61	72	20.36 *	13.8		68	20.848 *	14.6		0.051 **	0.000 ***	ns	non
		t5	12	8.52 ± 12.9	2.54	63	2.99	0.5	0.5	68	20.75 *	15.6	15.6	0.000 ***	0.04 ***	ns	non
	Male	**F2**	9	36.1 ± 8.07	3.45	87	1.42	0.8	15.5	79	-2.39 *	15.8	21.7	0.000 ***	0.007 ***	0.026 ***	**oui**
			11	20.3 ± 9.93	5.13	75	-2.43	14.7		71	-1.38 *	5.9		0.000 ***	0.000 ***	ns	non
Protéines totales ($g.g^{-1}$ N)	Femelle	**t5**	11	45.6 ± 6.07	3.75	80	0.5*	12	12	86	0.463 *	6.1	6.1	0.059 **	0.001 ***	ns	non

<u>Tableaux 24A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les teneurs en protéines solubles et totales quantifiées sur les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$ *: QTL significatif :* *** *à* $p<0.05$

QTL putatif : ** *à* $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.5$, + $0.15<p<0.2$.

XI.8. QTLs liés à la quantité de protéines dans les feuilles

XI.8.1. Protéines solubles

3 QTLs ont été détectés pour la quantité de protéines solubles exprimée par unité de surface foliaire tous situés sur la carte génétique mâle (Tableau 24A). Deux QTLs ont été détectés pour le flush 2 à 680 vpm [CO_2] sur les LG1 et LG5 de la carte, seul le premier étant significatif au niveau du génome et expliquant 32.1% de la variabilité phénotypique, mais déterminé à partir de seulement 44 valeurs. Le troisième QTL a été détecté pour le flush 3 (t5) à 380 vpm [CO_2] sur le LG7, mais n'est pas significatif.

1 seul QTL a été détecté pour la quantité de protéines solubles exprimée par unité de masse sèche sur le LG8 de la carte femelle, mais n'est pas significatif.

Aucun QTL n'a été détecté pour les protéines solubles par les analyses multi-environnementales.

XI.8.2. Protéines totales

7 QTLs ont été trouvés pour la quantité de protéines totale par unité de surface foliaire (Tableau 24A). 2 QTLs significatifs sont localisés sur les LG1 et LG9 de la carte génétique femelle, et sont liés aux mesures réalisées respectivement à 380 vpm [CO_2] sur le flush 3 et à 680 vpm [CO_2] sur le flush 2. Leurs effets sont tous les deux positifs et les QTLs expliquent 12.4 et 14.6% de la variabilité phénotypique. 3 QTLs ont été détectés pour les teneurs en protéines du flush 2, sur le LG2 et LG4 pour les mesures à 380 vpm [CO_2] (QTLs à effets négatifs) et sur le LG11 pour le flush 3 (QTL a effet positif), et tous sont significatifs. Des 2 QTLs détectés pour le flush 3 à 680 vpm [CO_2] et localisés sur les LG8 et LG12 de la carte mâle, seul le premier est significatif et explique 10.6% de la variabilité phénotypique.

L'analyse multi-environnementale a permit de détecter 3 QTLs sur la carte mâle uniquement pour la quantité de protéines totales par unité de surface sur le LG4 pour le flush 2 et sur les LG5 et 8 pour le flush 3. Seul ce dernier est significatif, mais ne présente pas de variation de son effet en réponse au [CO_2] (Tableau 24B).

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci 1 (cM)	Loci 2 (cM)	LOD	n	Effet 1	Effet 2	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Rubisco ($g.m^{-2}$)	Femelle	680 vpm - F2	11	20.9 ± 12.2		3.78	95	-27.41		0.000 ***	15.3	15.3
		380 vpm - t5	1	55.7 ± 13.9		2.04	95	4.38		0.178 +	10.1	10.1
	Male	380 vpm - t5	2	1.66 ± 8.74	83.5 ± 11.2	6.78	78	-6.022	3.592	0.000 ***	21.2	80.3
			7	23.8 ± 7.78		2.13	95	-3.88		0.183 +	8.6	
			8	31.8 ± 3.25	91 ± 9.69	7.98	84	6.377	-7.382	0.000 ***	38.8	
			11	31.8 ± 3.25	84 ± 9.05	5.32	88	-2.377	5.309	0.000 ***	11.7	
		680 vpm - t5	6	23.7 ± 10.1		2.71	100	23.73		0.015 ***	11.8	11.8
Rubisco ($mg.g^{-1}$ MS)	Femelle	380 vpm - F2	8	46.6 ± 7.22		2.55	85	0.35		0.071 **	12.8	12.8
		680 vpm - F2	6	29.4 ± 10.6		2.1	97	-0.25		0.146 *	8.7	23.6
			8	20.2 ± 5.55		3.38	83	0.32		0.000 ***	14.9	
		380 vpm - t5	2	59.9 ± 16.8		2.47	97	9.71		0.062 **	12.5	24.7
			11	18.4 ± 7.54		2.92	95	-9.6		0.000 ***	12.2	
		680 vpm - t5	2	61.2 ± 23.1		2.37	100	-7.28		0.113 *	9.8	9.8
	Male	380 vpm - F2	8	20.5 ± 18.3		2.61	80	0.33		0.041 ***	12.3	12.3
Rubisco ($g.g^{-1}$ N)	Male	680 vpm - t5	6	18 ± 10.4		2.75	87	2.42		0.000 ***	12.9	12.9
			11	45 ± 10.1		3.12	80	-2.76		0.008 ***	15.2	15.2
Rubisco ($g.g^{-1}$ Prot. totales)	Femelle	680 vpm - F2	1	57.7 ± 20		2.5	74	0.13		0.000 ***	12.7	12.7
		380 vpm - t5	11	19.4 ± 7.9		3.41	83	-5.88		0.059 **	17.4	17.4
		680 vpm - t5	2	71.5 ± 17.5		2.96	83	-5.26		0.000 ***	15.2	15.2
	Male	380 vpm - F2	8	24.3 ± 15.8		2.28	71	0.16		0.000 ***	13.8	13.8

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	P_{gen}	$P_{gen,EE}$	P_{mod}	CO_2
Rubisco ($g.m^{-2}$)	Femelle	**F2**	11	24 ± 15.7	3.41	94	4.63	0.6	0.6	83	-26.38 *	12.3	12.3	0.039 ***	0.239	ns	non
	Male	**t5**	11	68.3 ± 21	2.73	96	17.47	10.6	10.6	97	-16.66 *	5.1	5.1	0.128	0.495	ns	non
Rubisco ($mg.g^{-1}$ MS)	Femelle	**F2**	8	31.3 ± 12.4	2.79	82	0.08	0.6	0.6	83	0.3 *	12.1	12.1	0.093 **	0.029 ***	ns	non
		t5	2	56.7 ± 14	2.88	97	0.26	8.6	8.6	100	-0.2 *	6	6	0.142 *	0.9	0.006 ***	**oui**
Rubisco ($g.g^{-1}$ Prot. totales)	Femelle	**F2**	3	14.5 ± 6.77	3.62	75	-7.21	2	2	70	-15.07 *	12.2	12.2	0.151 +	0.115 *	ns	non
		t5	2	64.6 ± 17.3	3.51	87	15.14 *	8.9	27	84	-18.86 *	10.5	17.5	0.030 ***	1	0.000 ***	**oui**
			11	19.3 ± 6.36	5.48	83	-21.04*	18.1		66	11.26 *	7		0.000 ***	0.000 ***	ns	non
	Male	**F2**	8	26.3 ± 14.2	3.75	74	18*	15.6	15.6	66	11.26	7	7	0.034 ***	0.01 ***	ns	non

<u>Tableaux 25A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les teneurs en Rubisco dans les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$ *: QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

8 QTLs ont été détectés pour la quantité de protéines exprimée par unité de masse sèche foliaire (Tableau 24A). 6 QTLs ont été localisés sur la carte femelle, dont 5 QTLs sur les LG2, LG5, LG6, LG8 et LG10 pour le flush 2 (seuls ceux localisés sur les LG2 et LG6 étant significatifs) et 1 QTL non significatif sur le LG12. Les 2 QTLs localisés sur les LG11 et LG12 de la carte mâle sont significatifs et sont liés aux données obtenues à 380 vpm [CO_2] pour le flush 2.

5 QTLs ont été obtenus par l'analyse multi-environnementale (Tableau 24B), dont 3 sur les LG2 et 5 (flush 2) et le LG12 (flush 3) de la carte femelle. Seul ce dernier est significatif au niveau du génome et ne présente pas de variation significative de son effet sous fort [CO_2] excepté le fait que son effet est significatif uniquement à 680 vpm [CO_2]. Il explique de plus un pourcentage de la variance phénotypique très supérieur sous fort [CO_2] à celui observé sous [CO_2] ambiant. Les 2 QTLs détectés sur les LG9 et LG11 de la carte mâle sont significatifs et tous les deux liés au flush 2. La variance expliquée par le premier augmente sous fort [CO_2] et les effets des deux QTLs sont significatifs uniquement sous fort [CO_2].

1 QTL non significatif a été détecté par analyse simple et par analyse multi-environnementale pour la quantité d'azote exprimée par gramme d'azote dans les feuilles sur le LG11 de la carte génétique femelle.

XI.9. QTLs liés à la quantité et à l'activité de la Rubisco dans les feuilles

XI.9.1. Quantité de Rubisco dans les feuilles

10 QTLs ont été détectés pour la quantité de Rubisco exprimée par unité de surface foliaire (Tableau 25A). 2 QTLs se trouvent sur la carte génétique femelle, 1 QTL significatif sur le LG11 pour les données du flush 2 sous 680 vpm [CO_2], expliquant 15.3% de la variabilité phénotypique, et 1 QTL non significatif sur le LG1 pour les données du flush 3 sous [CO_2] ambiant. Les 8 QTLs qui ont été localisés sur la carte mâle sont tous liés aux mesures réalisées sur le troisième flush. Parmi eux, 7 QTLs sont liés aux mesures à 380 vpm [CO_2] sur les LG2, LG7, LG8 et LG11 (tous significatifs et liés par deux sauf celui sur le LG7) et expliquant au total près de 80% de la variabilité. 1 QTL significatif a été trouvé à partir des mesures à 680 vpm [CO_2] sur le LG6 mâle et explique 11.8% de la variabilité entre génotypes.

Seulement 2 QTLs ont été détectés pour la quantité de Rubisco par unité de surface grâce à l'analyse multi-environnements (Tableau 25B), tous deux situés sur les groupes de liaison 11 des cartes mâle (pour le flush 2) et femelle (pour le flush 3). Seul le QTL situé sur la carte femelle est significatif, et ne montre pas de variation significatives de son effet entre les traitements [CO_2] bien que seul l'effet calculé sous fort [CO_2] soit significatif. Ce QTL explique 12.3% de la variance sous fort [CO_2] alors que le PEV n'est que de 0.6% sous [CO_2] ambiant. Malheureusement, des problèmes de mise au point du logiciel n'ont pas pu permettre de conduire avec succès l'analyse multi-environnementale à deux QTLs liés afin de confirmer ou non les résultats trouvés sur l'analyse simple.

7 QTLs ont été également détectés pour la Rubisco exprimée par unité de masse foliaire (Tableau 25A). 6 QTLs se trouvent sur la carte génétique femelle, sur les LG6 et LG8 pour les mesures réalisées sur le flush 2 et sur les LG2 et LG11 pour les mesures sur le flush 3. Seuls 1 QTL pour le flush 2 à 680 vpm [CO_2] situé sur le LG8 et 1 QTL pour le flush 3 à 380 vpm [CO_2] sur le LG11 sont significatifs, d'effet négatif, et expliquent respectivement 14.9 et 12.2% de la variation. 1 QTL significatif a été localisé sur le LG8 de la carte mâle pour la quantité de Rubisco dans les feuilles du flush 2 à 380 vpm [CO_2] et explique 12.3% de la variabilité entre individus.

2 QTLs ont été détectés sur la carte génétique femelle par l'analyse multi-environnementale (Tableau 25B), un pour chaque flush, et ne sont pas significatifs au niveau du génome.

2 QTLs significatifs ont été trouvés pour la quantité de Rubisco exprimée par gramme d'azote pour les feuilles du flush 3 sous 680 vpm [CO_2], localisés sur les LG6 et LG11 de la carte mâle et expliquent à eux deux 28.1% de la variabilité entre les génotypes (Tableau 25A). Aucun QTL n'a été trouvé pour ce type d'expression de la Rubisco par l'analyse multi-environnementale.

4 QTLs ont été détectés enfin pour la quantité de Rubisco exprimée par gramme de protéines totales (Tableau 25A). 3 QTLs sont localisés sur la carte femelle, 1 QTL significatif est lié aux mesures sur le flush 2 à [CO_2] élevé sur le LG1, et 2 QTLs sur le LG2 et le LG11 femelles sont liés au flush 3 dont seul celui lié aux mesures à [CO_2] élevé (LG2) est significatif. Le QTL détecté sur le LG8 de la carte mâle est significatif et explique 13.8% de la variabilité des résultats du flush 2 à 380 vpm [CO_2].

L'analyse en multi-environnements a permis de détecter 4 QTLs (Tableau 25B) pour ce caractère, dont 3 sur la carte femelle. Sur celle-ci, 1 QTL lié au flush 2 se trouve sur le LG3 mais n'est pas significatif, et les deux QTLs liés au flush 3 sont localisés sur les LG2 et LG11 de la

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Act.Tot Rubisco (nkat.mg Prot^{-1})	Femelle	680 vpm - F2	8	19.7 ± 15.8	2.6	70	-0.44	0.043 ***	17.8	17.8
Act.Tot Rubisco (nkat.mg Rub^{-1})	Femelle	380 vpm - t5	8	30 ± 13.1	2.66	66	-0.44	0.057 **	18.9	18.9
	Male	380 vpm - t5	2	77 ± 15.7	2.18	67	0.39	0.181 +	14.7	14.7
% Activation Rubisco	Femelle	380 vpm - t5	6	23 ± 22.7	2.65	67	11.2	0.061 **	18.5	18.5

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Act.Tot Rubisco (nkat.mg Prot^{-1})	Femelle	t5	8	28.5 ± 16.5	2.74	70	-39.77 *	20.3	20.3	64	-0.37	0	0	0.136 *	0.186 +	ns	non
Act.Tot Rubisco (nkat.mg Rub^{-1})	Femelle	t5	8	33.4 ± 12.5	3.40	66	-0.44 *	19.3	19.3	63	0.25	7.1	7.1	0.000 ***	0.368	ns	-

Tableaux 26A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les activités totale, initiale et l'activation de la Rubisco (en nanokatal par gramme de protéine soluble ou de Rubisco) de dans les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
PEPc	Femelle	380 vpm - t5	8	41.1 ± 12.4	2.55	70	-38.79	0.071 **	14.2	28.6
			11	20.2 ± 11.5	3.15	77	41.3	0.000 ***	14.4	
		680 vpm - t5	11	4.82 ± 5.96	4.04	70	101.77	0.000 ***	28.8	28.8
HPR	Femelle	680 vpm - F2	7	59.6 ± 6.01	4.8	65	-17.73	0.000 ***	33.3	58.3
			8	19.8 ± 2.48	3.95	70	10.23	0.000 ***	12.8	
			9	18.3 ± 9.07	3.31	80	10.31	0.000 ***	12.2	
	Male	380 vpm - t5	12	18.3 ± 9.07	2.94	40	20.86	0.029 ***	33.4	

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
PEPc	Femelle	t5	8	45.5 ± 10.2	4.16	70	-40.35 *	14	27.9	61	31.11 *	8.1	27.7	0.000 ***	0.999	0.000 ***	oui
			11	11.1 ± 7.03	5.16	77	40.19 *	13.9		70	48.43 *	19.6		0.000 ***	0.000 ***	ns	non
GO	Femelle	F2	5	73.7 ± 22.4	3.19	85	-35.51	1.8	14.6	77	67.03 *	13.7	28.6	0.033 ***	0.109 *	ns	non
			8	26.7 ± 14.2	2.76	76	-10.39	0.5		70	64.11 *	12.5		0.137 *	0.873	0.006 ***	oui
			11	60.1 ± 11.8	3.81	97	-50.08 *	12.3		88	-28.07	2.4		0.039 ***	0.024 ***	ns	non
HPR	Femelle	F2	7	61.8 ± 7.43	4.5	73	-5.55	3.1	3.1	65	-18.16 *	29.7	29.7	0.115 *	0.024 ***	0.024 ***	oui
	Male	F2	9	30.1 ± 11.9	3.22	89	-9.38 *	8.6	8.6	81	-11.36 *	15.4	15.4	0.000 ***	0.012 ***	ns	non
GS	Male	F2	4	54.6 ± 13.2	2.78	86	-36.82	13.2	13.2	77	11.58	0.9	0.9	0.079 **	0.535	0.016 ***	oui

Tableaux 27A, B : QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les teneurs en Rubisco dans les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome p_{gen}, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($p_{gen,EE}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets (p_{mod}), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

*La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome p_{gen} : QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif : ** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

carte femelle, significatifs au niveau du génome, et leurs effets -significatifs dans les deux environnements- s'inversent selon l'analyse entre les traitements [CO_2]. Seul le QTL localisé sur le LG2 répond de manière significative au fort [CO_2].

XI.9.2. Activité de la Rubisco dans les feuilles

Aucun QTL n'a été détecté pour l'activité spécifique de la Rubisco initiale dans les feuilles.

1 QTL significatif a été trouvé pour l'activité totale de la Rubisco exprimé par rapport à la quantité de protéines solubles dans les feuilles du Flush 2 à [CO_2] élevé, sur le LG8 de la carte femelle (Tableau 26A). Il a été confirmé par l'analyse multi-environnementale, mais à partir des données du flush 3, et n'est pas significatif pour cette analyse (Tableau 26B).

2 QTLs non significatifs ont été détectés sur les LG8 femelle et LG2 mâle pour les activités totales exprimées par rapport à la quantité de Rubisco dans les feuilles du flush 3, à [CO_2] ambiant. De la même façon que précédemment, 1 QTL a été détecté pour ce caractère au flush 3 sur le LG8 de la carte femelle par analyse multi-environnementale (Tableau 26B). Ce QTL est par contre significatif au niveau du génome et répond de manière significative au changement de concentration en CO_2 dans l'atmosphere (son effet négatif est significatif uniquement sous [CO_2] ambiant).

XI.10. QTLs liés aux activités enzymatiques autres que la Rubisco

3 QTLs ont été détectés pour la PhosphoenolPyruvate carboxylase (PEPc) sur la carte génétique femelle uniquement, et pour les résultats du Flush 3 (Tableau 27A). Deux QTLs ont été détectés pour les résultats à 380 vpm [CO_2] sur les LG8 et LG11, et un QTL pour les données à 680 vpm [CO_2] sur le LG11 également. Seuls les QTLs trouvés sur le LG11 sont significatifs, mais ils ne sont pas colocalisés, et la variance expliquée par le QTL détecté pour le fort [CO_2] est double de celle du [CO_2] ambiant.

2 QTLs significatifs ont été détectés pour la PEPc en utilisant l'analyse multi-environnementale sur le LG8 de la carte femelle, ainsi que sur un loci intermédiaire aux deux trouvés par analyse simple sur le LG11 femelle (Tableau 27B). Le QTL localisé sur le LG8 semble répondre significativement au fort [CO_2], le signe de son effet étant opposé entre les deux traitements [CO_2].

A

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci 1 (cM)	Loci 2 (cM)	LOD	n	Effet 1	Effet 2	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Saccharose (mg.cm^{-2})	Male	380 vpm - F2	11	58.2 ± 12.4		2.5	93	223.34		0.055 **	10.3	10.3
Saccharose (mg.g^{-1} MS)	Femelle	680 vpm - F2	12	6.35± 12.3		2.63	64	145.47		0.087 **	17.2	17.2
	Male	380 vpm - F2	11	57.4 ± 19		2.03	93	281.59		0.108 *	8.4	8.4
		380 vpm - t5	7	19.9 ± 4.19	34.3 ± 4.49	3.82	72	-52.07	64.126	0.062 **	21.3	32.2
			9	43.8 ± 16.8		2.23	88	-31.34		0.158 +	10.9	

B

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Saccharose (mg.cm^{-2})	Male	**F2**	11	68.9 ± 13.6	3.75	85	60.56 *	11	11	78	48.04 *	9.7	9.7	0.027 ***	0.000 ***	ns	non
Saccharose (mg.g^{-1} MS)	Male	**F2**	2	77.3 ± 32.1	3.2	67	-54.47 *	12.3	23.5	64	-22.65	3.9	6.2	0.030 ***	0.062 **	ns	non
			6	51.3 ± 13.9	3.12	95	50.16 *	11.2		90	18.02	2.3		0.178 +	0.084 **	ns	non
		t5	9	36.8 ± 9.81	4.22	86	-53.68 *	15.1	15.1	88	-54.62 *	12.6	12.6	0.000 ***	0.000 ***	ns	non

<u>Tableaux 28A,B</u>: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les teneurs en saccharose dans les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\boldsymbol{p_{gen}}$ *: QTL significatif :* *** *à* $p<0.05$

QTL putatif : ** *à* $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.5$, + $0.15<p<0.2$.

Aucun QTL n'a été détecté par analyse simple pour l'activité de la Glycolate Oxydase (GO), mais 3 QTLs ont été trouvés sur la carte génétique femelle grâce à l'analyse multi-environnementale pour les activités du flush 2 (Tableau 27B). 1 QTL non significatif est localisé sur le LG8, et 2 QTLs significatifs sont situés sur le LG5 (avec un effet positif significatif uniquement sous fort [CO_2]) et le LG11 (à effet négatif significatif uniquement sous [CO_2] ambiant, mais non modifié significativement par le [CO_2]).

4 QTLs ont été détectés pour l'activité de l'Hydroxypyruvate réductase (HPR) et sont tous significatifs au niveau du génome (Tableau 27A). 3 QTLs liés aux mesures sur le flush 2 à fort [CO_2] sont localisés sur les LG7, LG8 et LG9 de la carte femelle, et expliquent au total 58.3% de la variance phénotypique. Le QTL détecté sur le LG12 de la carte mâle est lié aux mesures à [CO_2] ambiant sur le flush 3.

Seul le QTL localisé sur le LG7 de la carte femelle a été retrouvé par l'analyse multi-environnementale, ainsi qu'un nouveau QTL détecté sur le LG9 de la carte mâle mais qui n'est pas significatif (Tableau 27B). Le QTL détecté sur la carte femelle est significatif au niveau du génome, et présente une réponse significative à la concentration atmosphérique en [CO_2], avec un effet négatif significatif uniquement sous [CO_2] élevé.

Aucun QTL n'a été détecté par analyse simple pour l'activité de la Glutamine Synthétase (GS), mais 1 QTL non significatif a été détecté pour les résultats du flush 2 par analyse multi-environnementale sur le LG4 de la carte mâle (Tableau 27B).

XI.11. QTLs liés à la teneur en saccharose dans les feuilles

1 seul QTL non significatif a été détecté pour les concentrations en saccharose exprimées par unité de surface foliaire du flush 2 à 380 vpm [CO_2] sur le LG11 de la carte mâle (Tableau 28A).

1 QTL est également obtenu par analyse multi-environnementale sur le LG11 de la carte mâle à une dizaine de cM de celui détecté par analyse simple (Tableau 28B). Il est significatif au niveau du génome et ne montre pas de variation significative de son effet ni de la variance expliquée (10 à 11%) entre les deux traitements [CO_2].

A1

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Car. (mg.m-2)	Femelle	680 vpm - t5	11	23.7 ± 15.9	3.16	162	1.05	0.192 *	5.2	5.2
	Male	380 vpm - F2	11	57.9 ± 14.6	1.99	152	-1.61	0.012 ***	9.2	9.2
		680 vpm - F2	1	50.6 ± 13.1	2.55	113	1.28	0.036 ***	10	10
		380 vpm - F3	5	77.9 ± 14.6	2.95	99	1.89	0.021 ***	12.5	12.5
		680 vpm - F3	5	32.8 ± 23.8	2.24	130	1.57	0.173 +	6.2	26.1
			8	53.3 ± 21.4	2.71	134	1.77	0.061 **	7.9	
			9	53.3 ± 21.4	3.34	148	-2.15	0.000 ***	12	
Car. (mg.g-1 MS)	Femelle	680 vpm - F2	7	71.2 ± 11.9	2.77	106	-13.43	0.012 ***	9.2	28.1
			8	23.7 ± 13.1	2.66	131	12.85	0.043 ***	7.6	
			9	43.7 ± 8.98	2.95	104	15.27	0.024 ***	11.3	
	Male	680 vpm - F2	11	59.3 ± 9.76	2.86	153	-13.02	0.024 ***	8.3	8.3

A2

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Chl. (mg.m-2)	Femelle	380 vpm - t5	8	31 ± 15.8	2.04	135	0.53	0.198 +	5.7	13.7
			11	27 ± 15.8	2.86	152	-0.61	0.048 ***	8	
	Male	380 vpm - F2	11	58.5 ± 8.9	2.85	162	0.52	0.04 ***	7.3	7.3
		680 vpm - t5	9	24.3 ± 15.5	2.35	148	-0.71	0.178 +	8.8	8.8
Chl. (mg.g-1 MS)	Femelle	380 vpm - F2	2	15.6 ± 13.2	2.4	122	-0.24	0.071 **	8.8	8.8

A3

Caractère	Carte	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	p_{gen}	PEV	PEV cumulé
Pig. (mg.m-2)	Femelle	680 vpm - F2	8	22.5 ± 15.4	1.99	136	0.5	0.149 *	6.8	20
			9	44.3 ± 13	2.85	107	0.71	0.000 ***	13.2	
		380 vpm - t5	11	24.9 ± 15.5	2.56	152	-0.7	0.071 **	6.9	6.9
	Male	380 vpm - F2	11	57.8 ± 9.15	3	162	0.63	0.008 ***	7.6	7.6
		680 vpm - F2	1	49.9 ± 13.5	2.63	113	0.6	0.036 ***	9.8	9.8
		380 vpm - t5	9	56.2 ± 14.7	2.25	142	-0.7	0.104 *	6.8	12.8
			11	53.9 ± 15	2.2	159	0.65	0.108 *	6	
		680 vpm - t5	8	49 ± 19	2.58	134	0.8	0.071 **	7.6	18.5
			9	21.2 ± 12	3.07	148	-0.97	0.036 ***	10.9	
Pig. (mg.g-1 MS)	Male	680 vpm - F2	11	54.5 ± 13	2.11	154	-0.25	0.123 *	6.1	6.1

B1

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Car. (mg.m-2)	Male	F2	1	49.9 ± 13.5	2.88	114	0.501	1.1	1.1	113	1,284*	10.2	10.2	0.183 +	0.104 *	ns	non
		t5	3	21.2 ± 8.99	2.7	142	1.046*	3.2	18.1	140	1.191	3.2	21.2	0.162 +	0.071 **	ns	non
			5	62 ± 32.1	3.61	99	1.749	8.9		97	1.2*	3.3		0.021 ***	0.01 ***	ns	non
			8	58.2 ± 26.7	3.47	135	0.964*	2.8		134	1.621*	5.8		0.109 *	0.01 ***	ns	non
			9	32.1 ± 10.9	3.94	152	-1.053*	3.2		148	-1.979*	8.9		0.036 ***	0.000 ***	ns	non
Car. (mg.g-1 MS)	Female	t5	7	70.6 ± 13.2	3.36	103	-1.409	0.1	0.1	106	-14.77 *	9.3	20.9	0.0121 ***	0.198 +	0.010 ***	**oui**
			9	37.3 ± 15.9	3.21	99	-0.523	0		104	15.98*	11.6		0.048 ***	0.592	0.005 ***	**oui**
	Male	F2	11	55.9 ± 14.3	3.74	152	-2.178	0.3	0.3	153	-14.56*	9.9	9.9	0.103 *	0.016 ***	0.020 ***	**oui**

B2

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Chl. (mg.m-2)	Male	F2	1	51.4 ± 15.3	3.45	114	3.469	3.6	3.6	113	4.789*	9.4	9.4	0.071 **	0.018 ***	ns	non
		t5	3	20.4 ± 7.38	2.88	142	4.089*	3.7		140	4.826*	4.2		0.084 **	0.029 ***	ns	non
			5	54 ± 35.8	2.83	99	5.471	6.5		97	5.544*	5.6		0.128 *	0.061 **	ns	non
			9	32.3 ± 13.8	3.86	152	-4.273	4		148	-7.006*	8.9		0.024 ***	0.000 ***	ns	non

B3

						380 vpm				680 vpm							effet
Caractère	Carte	Date	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effet	PEV	PEV cumulé	n	Effet	PEV	PEV cumulé	p_{gen}	$p_{gen,EE}$	p_{mod}	CO_2
Pig. (mg.m-2)	Femelle	t5	11	19.4 ± 10.3	4.3	152	-8.183 *	9.7	9.7	148	-4.617	2.6	2.6	0.000 ***	0.000 ***	ns	non
	Male	F2	1	46.5 ± 14.3	3.24	114	3.65	2.5	2.5	113	6.085*	10.1	10.1	0.071 **	0.136 *	ns	non
		t5	3	20.2 ± 6.98	3.04	142	5.34 *	4		140	6.11 *	12		0.084 **	0.057 **	ns	non
			5	56.5 ± 34.9	2.97	99	7.14	7.1		97	6.99*	5.5		0.154 +	0.021 ***	ns	non
			8	55.1 ± 26	3.01	135	4.87	3.3		134	6.54*	4.8		0.109 *	0.021 ***	ns	non
			9	31.6 ± 12.5	4.1	152	-5.45*	4.1		148	-9.18*	9.7		0.0121 ***	0.000 ***	ns	non

Tableaux 29A,B: QTLs détectés par CIM simple (Composite Interval Mapping, Tableau A) et par analyse multienvironnementale (Tableau B) pour les teneurs en caroténoïdes (A1 et B1), chlorophylles (*a+b*) (A2 et B2) et en pigments totaux (A3 et B3) dans les feuilles de chêne des flushs 2 (F2) et 3 (t5) sous 380 ou 680 vpm [CO_2].

Les QTLs sont référencés en fonction de la **carte** génétique (male ou femelle) sur laquelle ils ont été localisés, le groupe de liaison (**LG**) concerné, le **loci** (en cM; correspondent à l'emplacement du QTL à partir du début du groupe de liaison ± écart type calculé par le test de boostrap), le **LOD** (Logarithm Odds, dont l'emplacement du pic et sa hauteur déterminent le loci et la significativité du QTL), le nombre **n** de pleins-frères utilisés pour la détection du QTL, l'**effet** estimé du QTL sur la réponse phénotypique de l 'arbre (avec une étoile: effet significatif) et le **PEV** (Percentage of Explained Variance, pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le QTL) pour chaque environnement ([CO_2]), la probabilité du QTL au niveau du génome $\mathbf{p_{gen}}$, la probabilité du QTL au niveau du génome dans le modèle où l 'on suppose que les effets sont équivalents entre les deux traitements [CO_2] ($\mathbf{p_{gen,EE}}$), la significativité de la différence entre les deux modèles d'effets ($\mathbf{p_{mod}}$), et l'effet du CO_2 sur le QTL.

La probabilité du QTL est donnée au niveau du génome $\boldsymbol{p_{gen}}$ *: QTL significatif : *** à p<0.05*

*QTL putatif :** à 0.05<p<0.1 , * 0.1<p<0.5 , + 0.15<p<0.2.*

4 QTLs non significatifs sont détectés à partir des teneurs en saccharose exprimées par unité de masse foliaire (Tableau 28A), 1 QTL sur le LG12 de la carte femelle, et 3 QTLs sur les LG7, LG9 et LG11 de la carte mâle, pour les deux flushs.

L'analyse multi-environnements permet de détecter 3 QTLs sur la carte mâle pour ces données (Tableau 28B). Deux QTLs sont obtenus pour les données du flush 2, un QTL significatif sur le LG2 qui n'est pas significativement modifié par le traitement [CO_2] (bien que son effet soit significatif uniquement sous [CO_2] ambiant) mais dont le PEV est presque divisé par 3 sous fort [CO_2] (3.9% au lieu de 12.3%), et un QTL non significatif sur le LG6. Le dernier QTL détecté sur la carte mâle est significatif au niveau du génome et localisé sur le LG9, son effet négatif et son PEV ne répondant pas de manière significative au [CO_2].

XI.12. QTLs liés aux teneurs en pigments dans les feuilles

XI.12.1. Teneur en caroténoïdes dans les feuilles

7 QTLs ont été détectés pour la concentration en caroténoïdes exprimée par unité de surface foliaire (Tableau 29A1). Le seul QTL détecté sur la carte génétique femelle se situe sur le LG11 et n'est pas significatif au niveau du génome. Il correspond à la teneur en caroténoïdes du flush 3 sous 680 vpm [CO_2]. Les 6 autres QTLs se trouvent sur la carte mâle, et 4 d'entre eux sont significatifs, chacun correspondant à une condition environnementale et une date différentes. Ils sont localisés sur les LG1 (Flush 2, [CO_2] élevé), LG5 (Flush 3, [CO_2] ambiant), LG9 (Flush 3, [CO_2] élevé) et LG11 (Flush 2, [CO_2] ambiant), les deux premiers ont des effets positifs et les deux derniers des effets négatifs. Tous expliquent environ 10 à 12% de la variabilité phénotypique observée.

L'analyse multi-environnementale a permis de trouver 5 QTLs tous localisés sur la carte génétique mâle (Tableau 29B1). Le seul QTL trouvé pour le flush 2 n'est pas significatif. Parmi les 4 autres QTLs liés au flush 3, 2 ne sont pas significatifs et se trouvent sur les LG3 et LG8, et 2 sont significatifs et sont localisés sur les LG5 (QTL a effet positif) et LG9 (QTL a effet négatif) et ne présentent pas de réponse significative au traitement [CO_2], même si sous [CO_2] élevé, le PEV du premier QTL diminue et celui de second QTL augmente inversement.

4 QTLs significatifs ont été détectés pour la teneur en caroténoïdes exprimée par unité de masse sèche, mesurée sur le flush 2 à 680 vpm [CO_2] (Tableau 29A1). 3 QTLs sont localisés sur les LG7, LG8 et LG9 de la carte génétique femelle et expliquent 28.1% de la variabilité phénotypique. Le QTL détecté sur la carte mâle se trouve sur le LG11 et explique 8.3 % de la variabilité entre génotypes.

3 QTLs ont été trouvés par analyse multi-environnementale (Tableau 29B1), dont 2 QTLs significatifs sur les LG7 et 9 de la carte génétique femelle et liés au flush 3, et présentant tous les deux une réponse significative au [CO_2] élevé (les effets sont significatifs uniquement sous fort [CO_2]). 1 QTL a été détecté sur le LG11 de la carte génétique mâle et code pour les données du flush 2, mais n'est pas significatif.

XI.12.2. Teneur en chlorophylles dans les feuilles

4 QTLs ont été détectés pour la concentration en chlorophylles *a et b* exprimée par unité de surface foliaire (Tableau 29A2). Les 2 QTLs localisés sur les LG8 et 11 de la carte génétique femelle sont liés aux données du flush 3 à [CO_2] ambiant, et seul celui sur le LG11 est significatif au niveau du génome et explique 8% de la variance entre les génotypes. Les 2 QTLs détectés sur les LG9 et LG11 de la carte génétique mâle sont liés respectivement aux données du flush 3 à [CO_2] élevé, et aux données du flush 2 à [CO_2] ambiant. Là aussi, seul le QTL situé sur le LG11 est significatif au niveau du génome.

L'analyse multi-environnementale a détecté 4 QTLs localisés sur les groupes de liaison 1 (flush 2), LG3, LG5 et LG9 (flush 3) de la carte génétique mâle (Tableau 29B2). Seul le dernier est significatif au niveau du génome et ne présente pas de modification de son effet sous fort [CO_2], bien que son effet ne soit significatif que sous fort [CO_2].

1 seul QTL non significatif a été détecté pour la concentration en chlorophylles exprimée par unité de masse sèche, localisé sur le LG2 de la carte femelle pour les données du flush 2 à [CO_2] ambiant (Tableau 29A2).

Aucun QTL n'a été détecté par l'analyse multi-environnementale.

XI.12.3. Teneur en pigments totaux dans les feuilles

9 QTLs ont été détectés pour la teneur en pigments totaux (caroténoïdes + chlorophylles) exprimée par unité de surface foliaire (Tableau 29A3). 3 QTLs sont localisés sur les LG8, LG9 (flush 2, [CO_2] élevé) et LG 11 (flush 3, [CO_2] ambiant) de la carte femelle. Seul le deuxième QTL est significatif au niveau du génome et il explique 13.2 % de la variabilité phénotypique. Parmi les 6 QTLs localisés sur les LG1, LG8, LG9 et LG11 de la carte mâle, trois seulement sont significatifs et sont localisés sur le LG1 pour les valeurs du flush 2 à [CO_2] élevé, sur le LG9 pour les valeurs du flush 3 à [CO_2] élevé, et sur le LG11 pour les valeurs du flush 2 à [CO_2] ambiant.

L'analyse multi-environnementale effectuée sur ces données a détecté 1 QTL significatif sur le LG11 de la carte femelle pour le flush 3 qui ne présente pas de réponse significative au fort [CO_2], malgré le fait que son effet négatif ne soit plus significatif sous [CO_2] élevé et que son pourcentage de variance expliquée sous fort [CO_2] soit inférieur à celui noté sous [CO_2] ambiant (Tableau 29B3). 5 QTLs ont été détectés sur les LG1, LG3, LG5, LG8 et LG9 de la carte mâle, seul le dernier étant significatif. Celui-ci est lié aux données du flush 3 et ne présente pas de variation significative de son effet négatif à une variation de [CO_2], malgré des valeurs un peu plus marquées de son effet significatif et du PEV sous [CO_2] élevé.

1 seul QTL a été détecté pour les valeurs de concentration en pigments par unité de masse sèche foliaire sur le LG11 de la carte mâle, mais n'est pas significatif (Tableau 29A3).

Aucun QTL n'a été détecté pour ce caractère par analyse multi-environnementale.

L'ensemble des QTLs positionnés sur les groupes de liaison des cartes génétiques parentales mâle et femelle est présenté dans les Figures 21 à 32 suivantes.

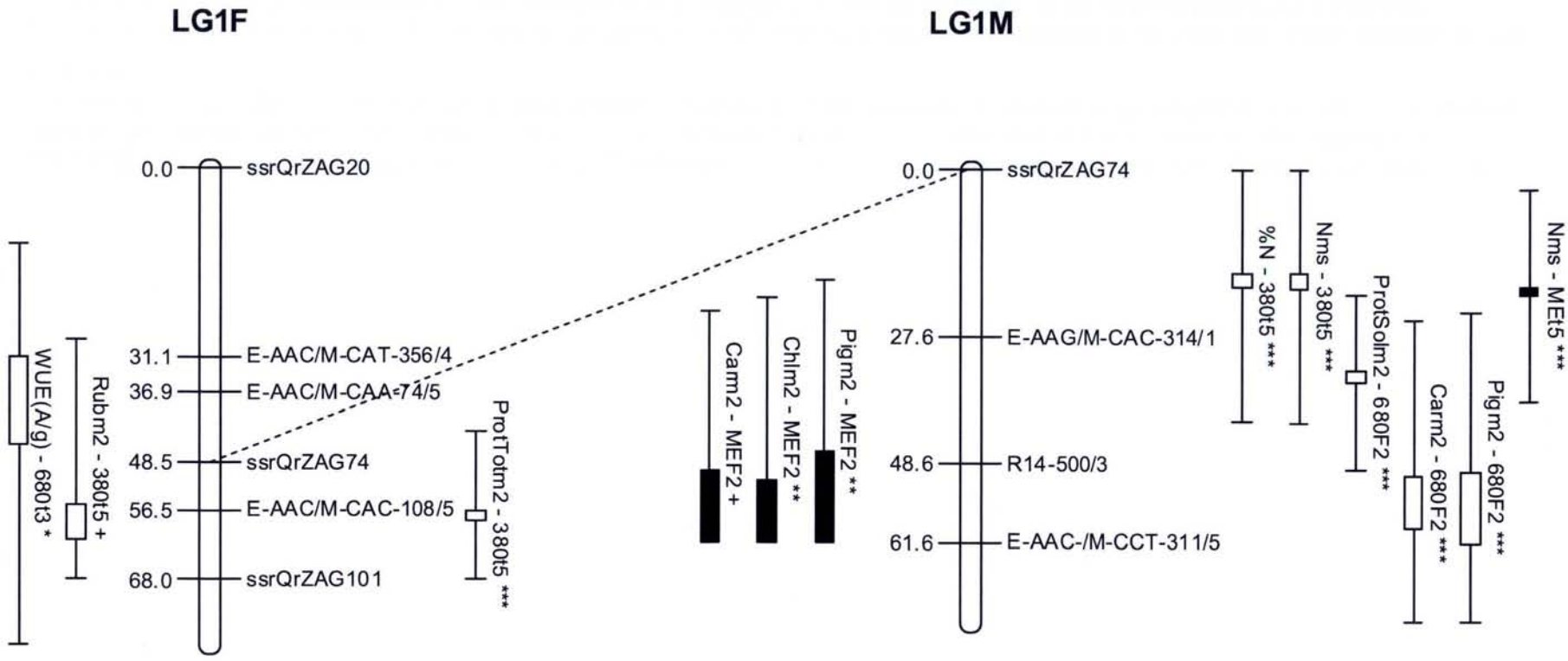


Figure 21 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 1 des cartes femelle (LG1F) et male (LG1M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés.

Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

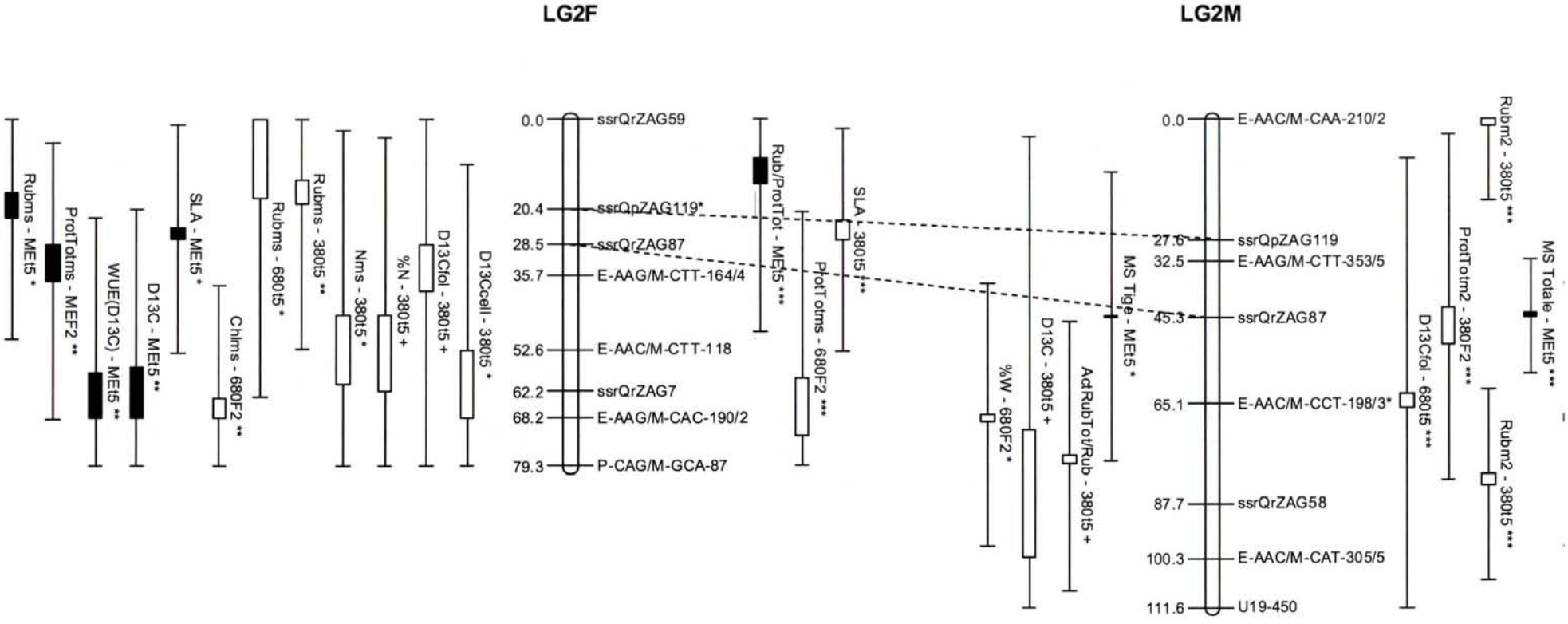


Figure 22 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 2 des cartes femelle (LG2F) et male (LG2M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

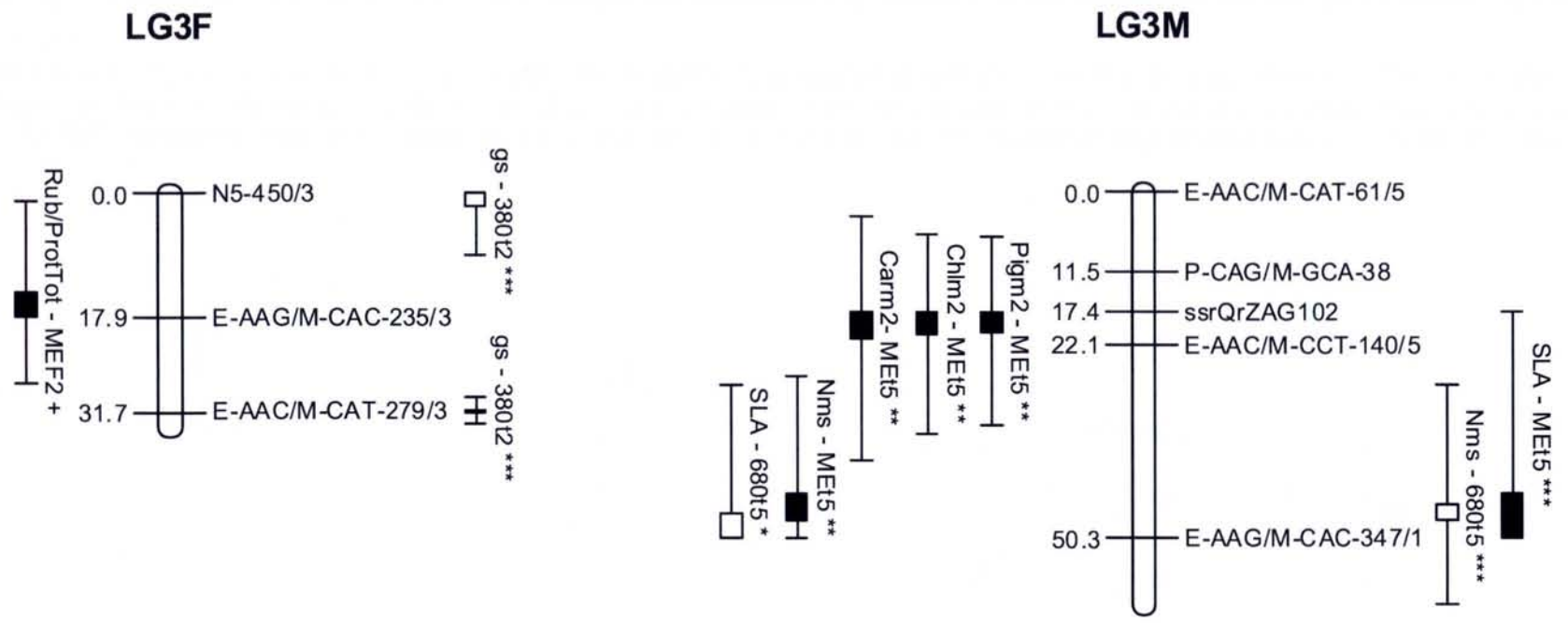
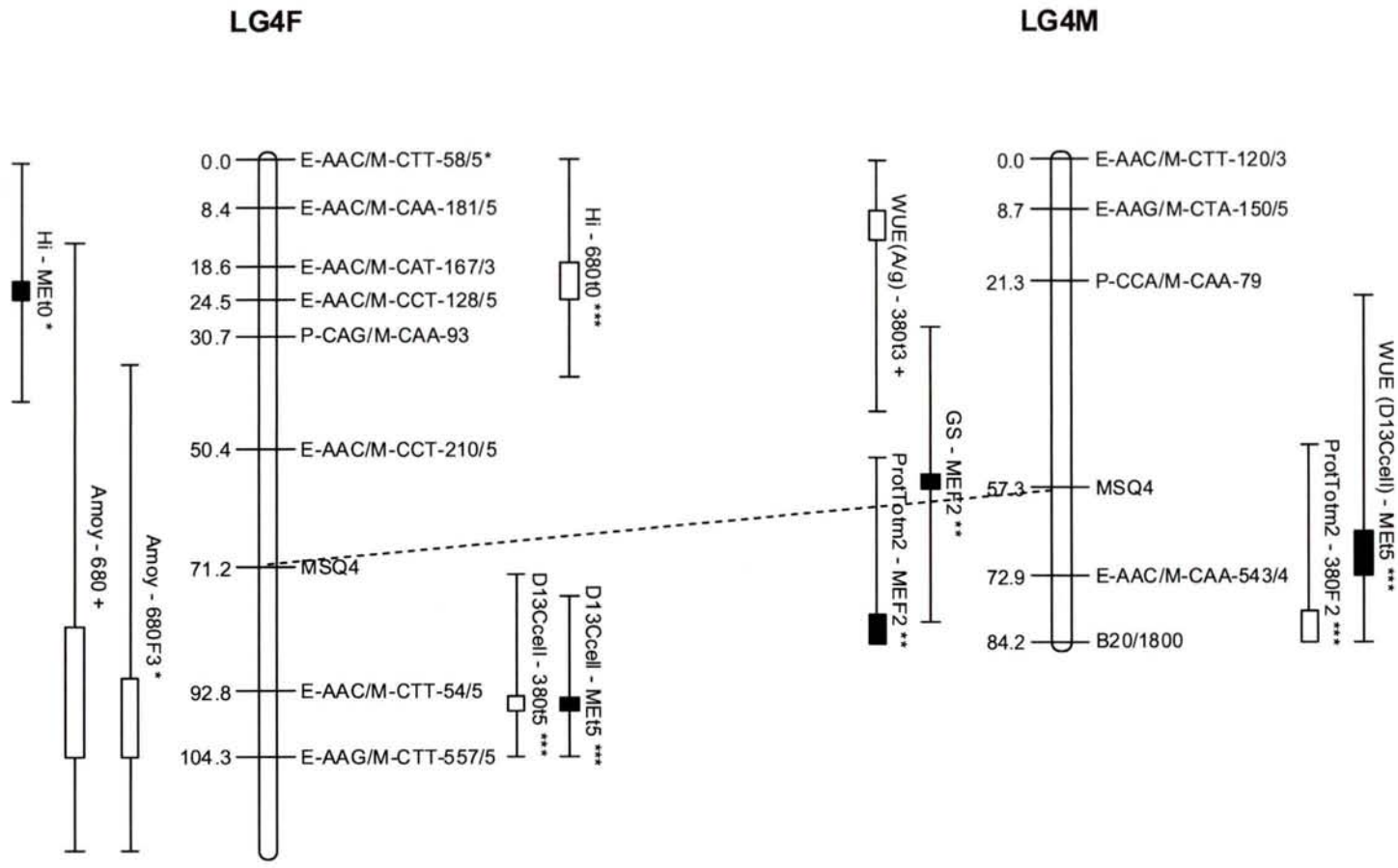


Figure 23 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 3 des cartes femelle (LG3F) et male (LG3M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.



<u>Figure 24 :</u> Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 4 des cartes femelle (LG4F) et male (LG4M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

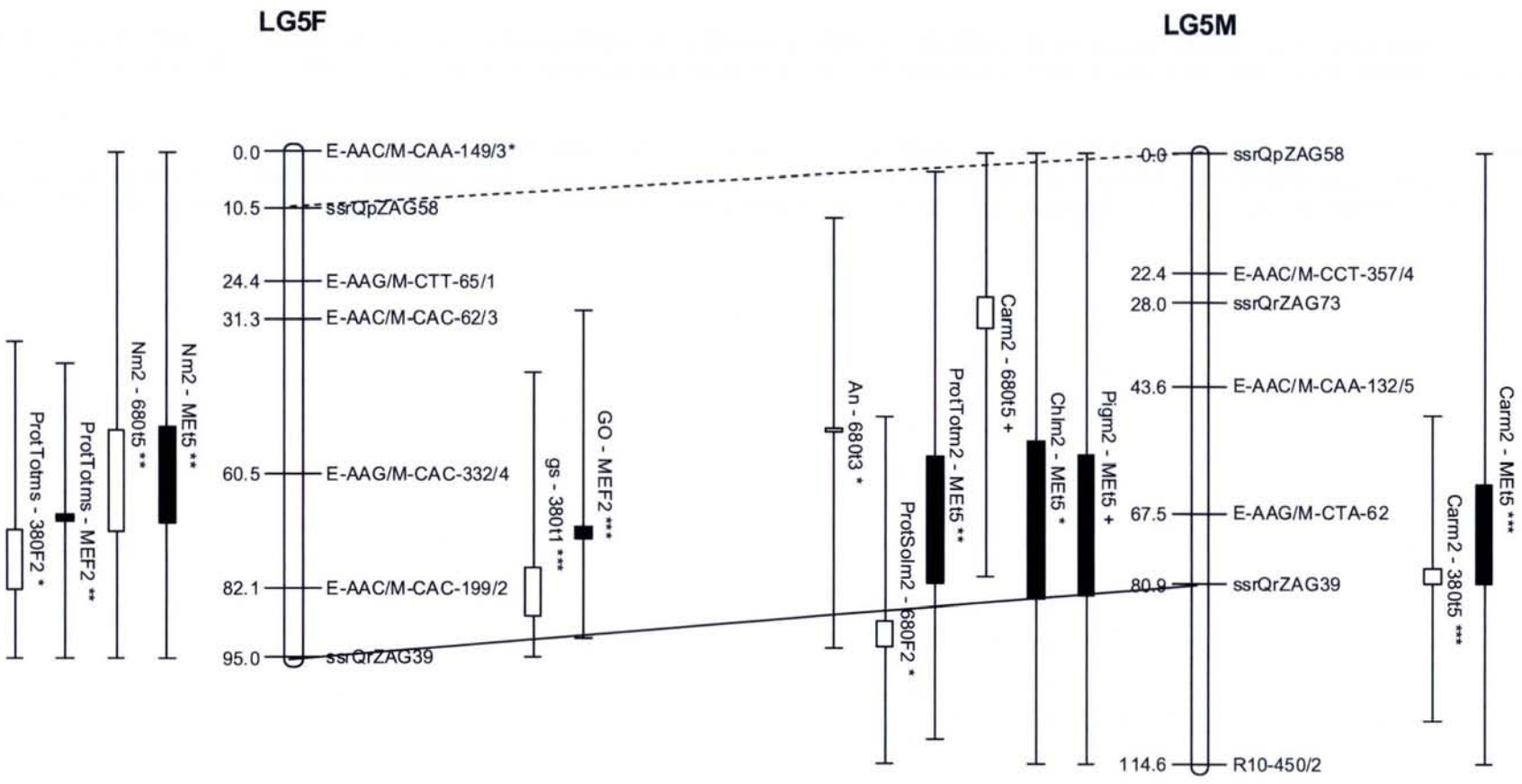


Figure 25 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 5 des cartes femelle (LG5F) et male (LG5M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

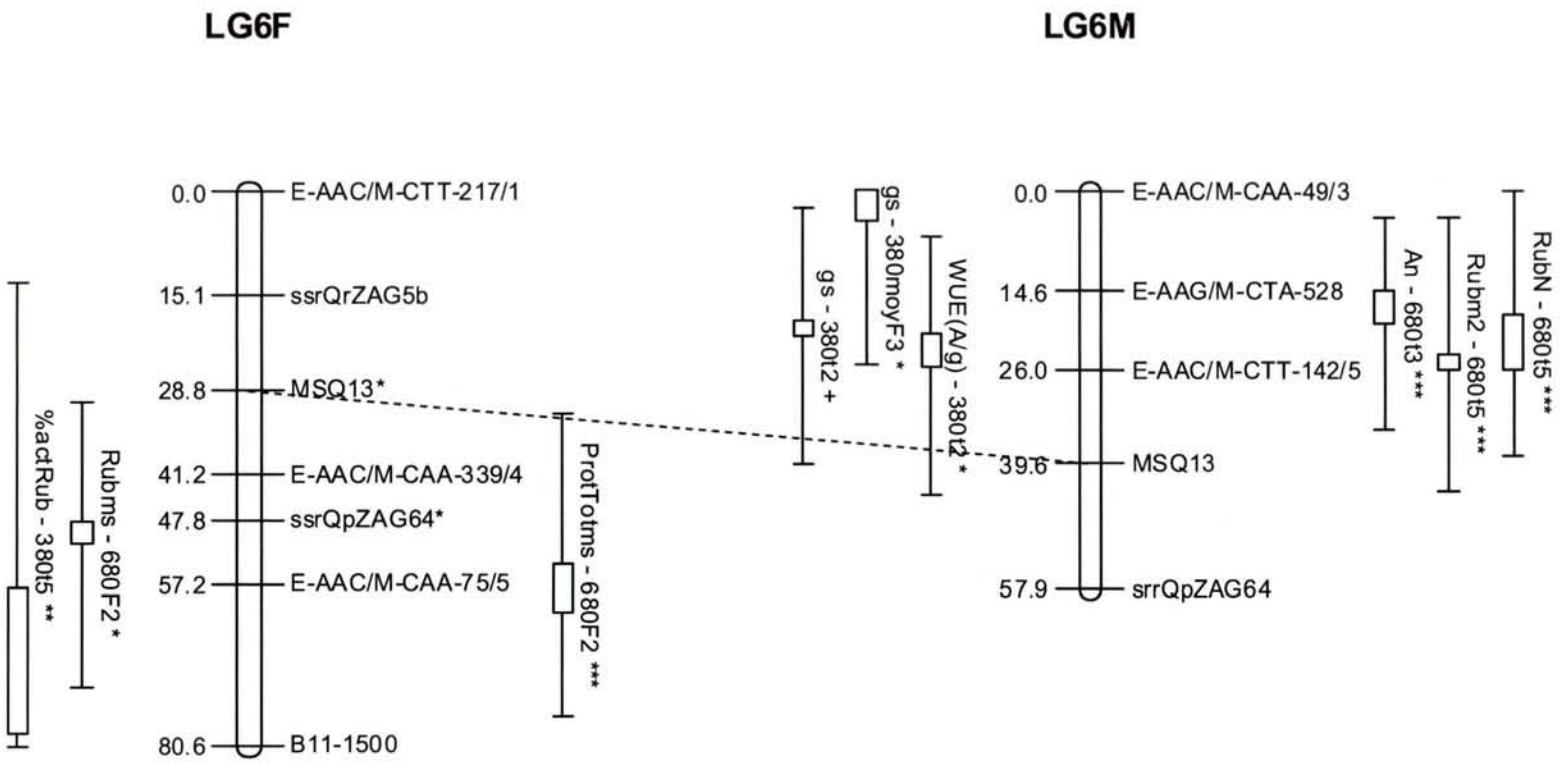


Figure 26 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 6 des cartes femelle (LG6F) et male (LG6M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

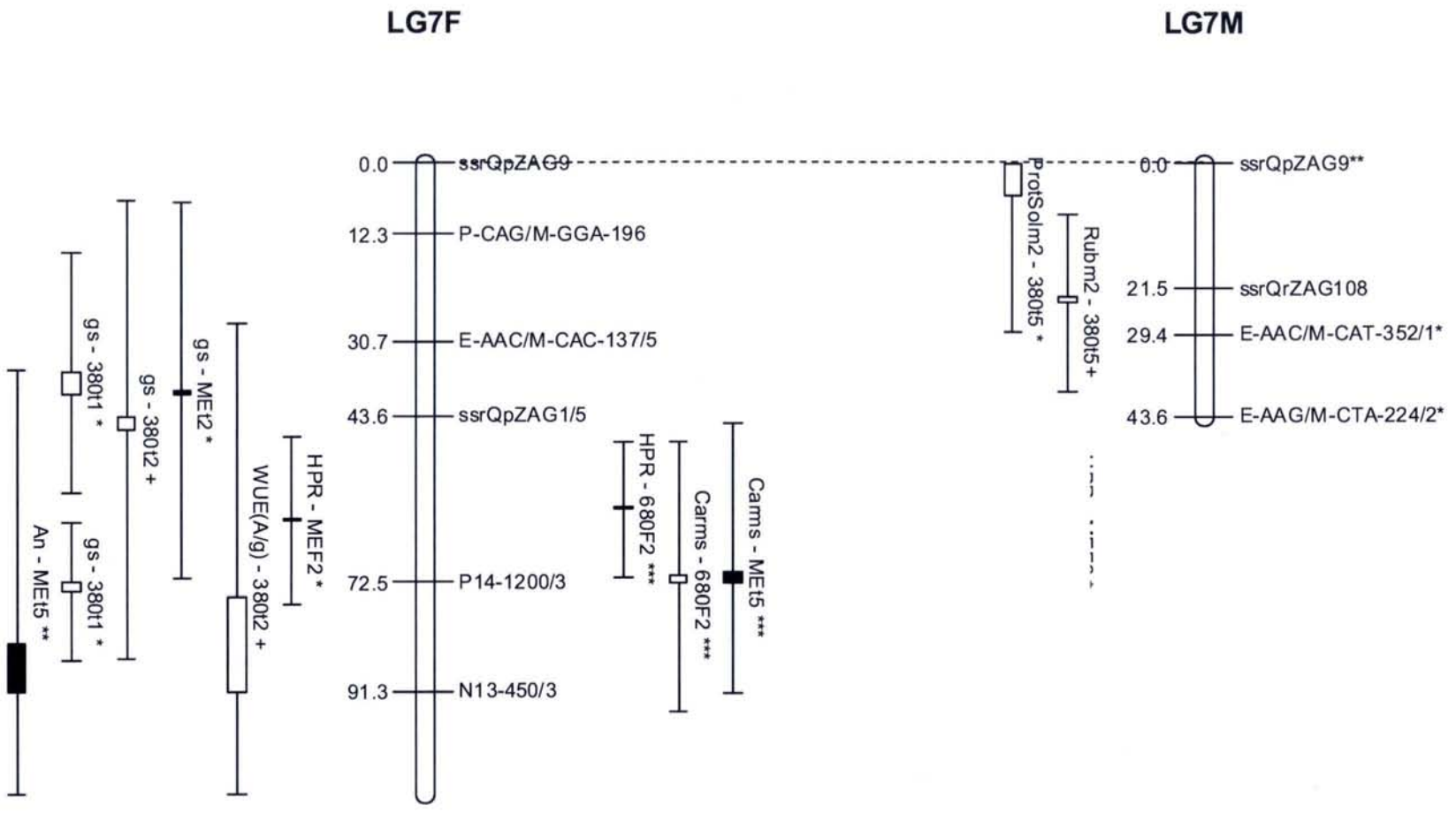


Figure 27 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 7 des cartes femelle (LG7F) et male (LG7M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

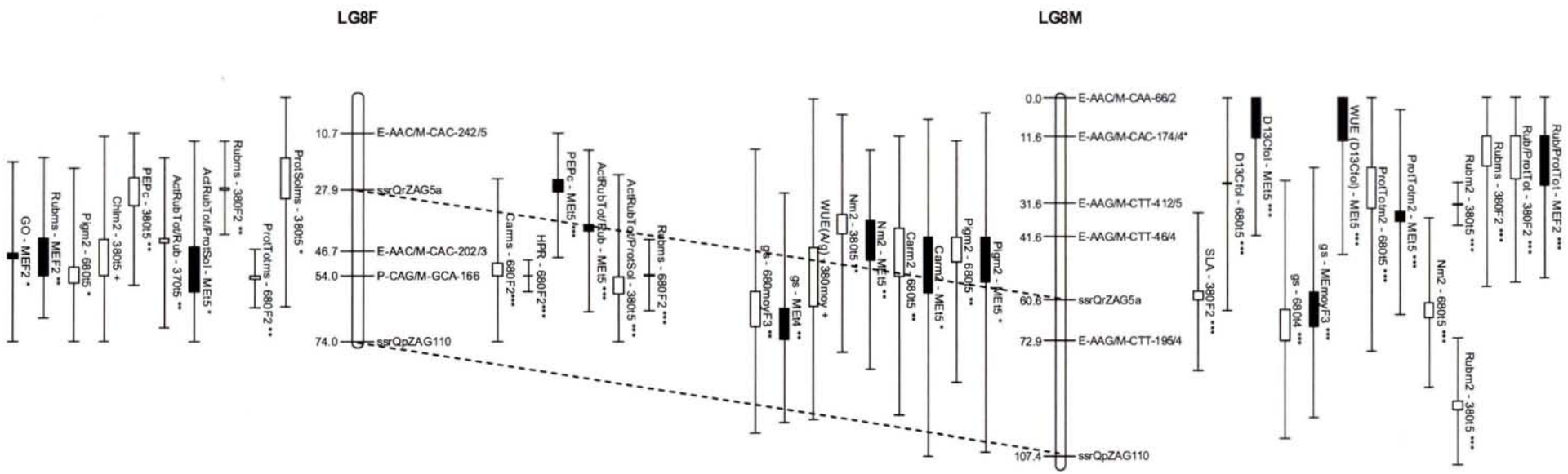


Figure 28 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 8 des cartes femelle (LG8F) et male (LG8M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

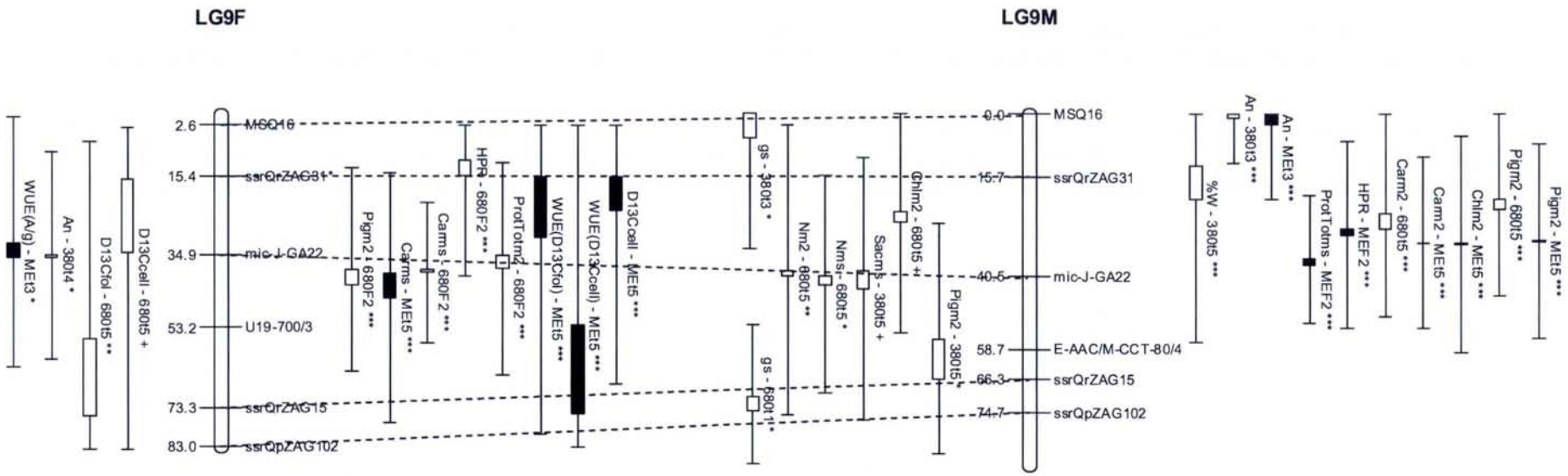


Figure 29 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 9 des cartes femelle (LG9F) et male (LG9M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

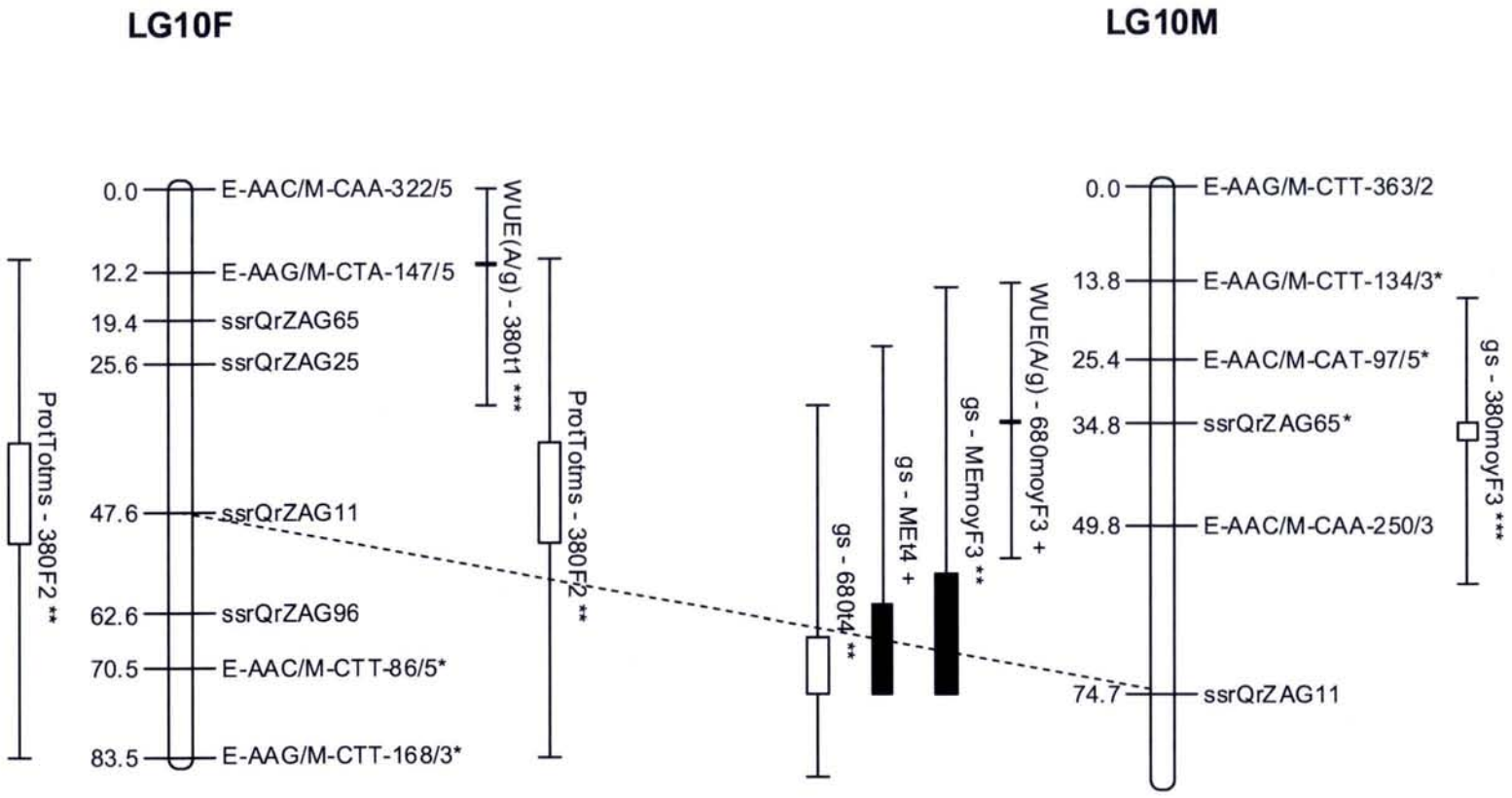
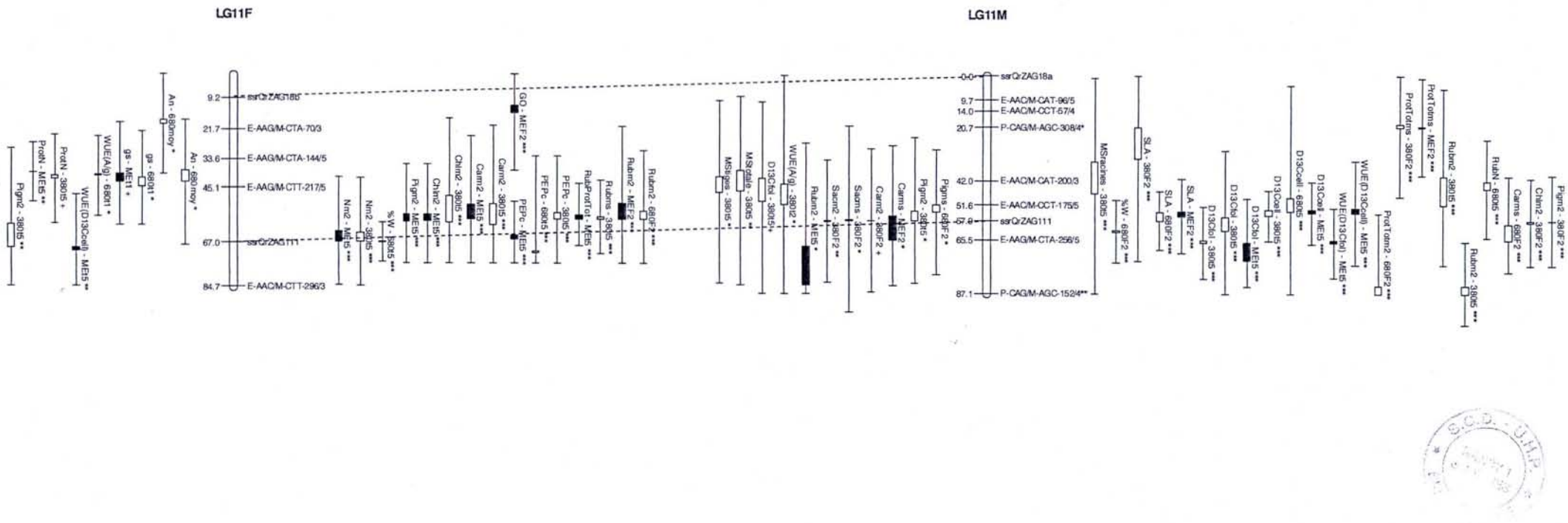


Figure 30 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 10 des cartes femelle (LG10F) et male (LG10M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.



S.C.D. - U.H.P.

Figure 31 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 11 des cartes femelle (LG11F) et male (LG11M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

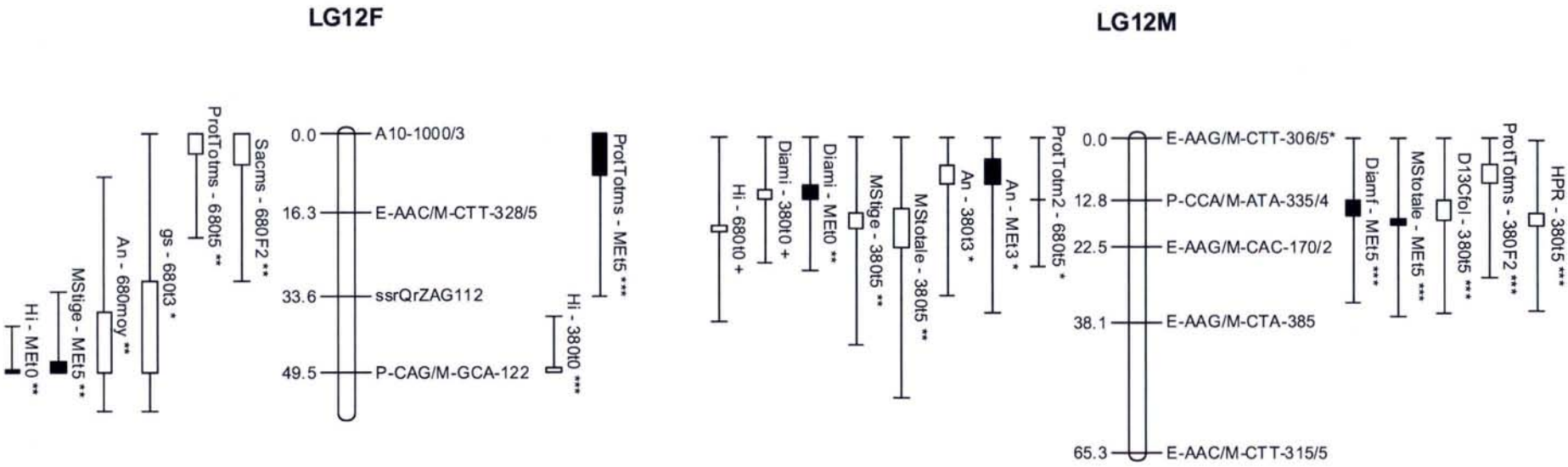


Figure 32 : Localisation des QTLs détectés sur le groupe de liaison 12 des cartes femelle (LG12F) et male (LG12M) des parents de la famille de chênes pédonculés étudiés. Les QTLs sont représentés par des barres dont les extrémités correspondent aux valeurs maximales de LOD obtenues par CIM (Composite Interval Mapping) et analyse Bootstrap, l'intervalle de confiance étant donné par analyse bootstrap.

Les QTLs détectés par analyse traditionnelle et multienvironnementale sont représentés respectivement par des barres évidées et des barres pleines. Les QTLs significatifs (***) sont représentés du côté droit du groupe de liaison, et les QTLs putatifs (**,*,+) à gauche.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. EFFET DU [CO_2] ELEVE SUR LA CROISSANCE ET LE METABOLISME

I.1. Modifications de la croissance et des paramètres foliaires

La réponse la plus évidente de la croissance au [CO_2] élevé a été celle de la biomasse, qui a été stimulée en moyenne de 45 % pour un individu en fin de saison de végétation, ce qui correspond à l'ordre de grandeur observé dans plusieurs expériences menées sur les feuillus (Badeck *et al.*, 1997a,b ; Picon *et al.*, 1997 ; Gielen & Ceulemans, 2001 ; Maroco *et al.*, 2002). L'élévation de l'efficience de l'assimilation carbonée (voir chapitre suivant) est très certainement à l'origine de cette élévation de la biomasse. Toutefois, on peut penser aussi que la croissance a également été favorisée car ces puits de carbone n'ont pas été limités dans leur développement (Thomas & Strain, 1991) et ont pu accumuler les grandes quantités de photosynthétats produits sous fort [CO_2] comme supposé par Farrar & Williams (1991) et Mousseau & Saugier (1992) pour les arbres à fort potentiel de croissance.

La biomasse racinaire a été d'ailleurs plus fortement stimulée (+53%) que la biomasse aérienne (le rapport R/A est significativement plus élevé de 5.4% sous 680 vpm [CO_2]), comme Norby & O'Neill (1991) et Kubiske *et al.* (1997) l'avaient déjà signalé dans leurs expériences. Cela va cependant à l'encontre d'autres expériences menées sur les chênes et qui avaient conclu à une diminution du rapport entre partie aérienne et partie racinaire (Norby *et al.*, 1995 ; Picon *et al.*, 1996a ; Vivin et al., 1996) ou à l'absence de modification de ce rapport (Picon *et al.*, 1997 ; Maillard *et al.*, 2001 ; Maroco *et al.*, 2002). Compte - tenu de la fertilisation apportée au long de l'expérience, on peut supposer que cette stimulation préférentielle de la croissance racinaire n'était pas lié à une carence minérale dans la terre qui justifierait un investissement plus important dans la plante pour son système racinaire. Une autre hypothèse peut être formulée lorsque l'on calcule la proportion de biomasse racinaire par rapport à la biomasse totale. En effet, les racines ne représentent que 25% environ de la biomasse totale, ce qui est très inférieur à ce que Picon *et al.* (1996a) avaient trouvé sur des plantules de chênes pédonculés. La question qui

se pose alors est de savoir si la méthode de bouturage des chênes n'a pas perturbé leur développement racinaire, et si les arbres ne se « rattraperaient » pas dans un environnement favorable comme celui des serres et encore plus sous fort [CO_2] que sous [CO_2] ambiant. Une production et un renouvellement accrus des racines et en particulier des racines fines pourrait ainsi être à lié à cette augmentation de biomasse racinaire (Pregitzer *et al.*, 1995 ; Lopez *et al.*, 1997 ; Ceulemans *et al.*, 1999 ; Wan *et al.*, 2003). Enfin, Gorissen *et al.* (1995) ont émis une dernière hypothèse selon laquelle la biomasse racinaire serait favorisée en fin de saison chez les arbres décidus, afin de constituer des réserves carbonées pour le passage de la saison hivernale. Il est possible que ce phénomène ait déjà été enclenché lors des mesures de biomasse qui ont eu lieu fin septembre. Norby *et al.* (1996) ont tiré des conclusions similaires de leur expérience sur le chêne blanc, pour lequel ils ont observé une stimulation initiale de la croissance par le [CO_2] élevé les premiers mois, puis un retour à une croissance identique à celle des témoins à plus long terme, la biomasse finale plus élevée étant donc liée à l'avance prise dans les premiers mois de croissance. Un suivi cinétique de la biomasse aurait été nécessaire pour déterminer si tel était le cas, mais n'était pas possible étant donné les conditions expérimentales.

La biomasse finale des tiges est supérieure de 45% pour les chênes ayant poussé sous fort [CO_2] à celle des chênes sous [CO_2] ambiant, et est corrélée de manière constante à environ 56% (Annexe 8a) avec la hauteur finale des arbres (plus élevée de 25.5% sous fort [CO_2]), quel que soit le traitement [CO_2], et à 72 et 65% respectivement avec le diamètre final à 380 et 680 vpm [CO_2]. La concentration élevée en CO_2 semble donc perturber la corrélation entre la biomasse et le diamètre des tiges (qui est significativement supérieur de 10% pour les arbres sous fort [CO_2], valeur très inférieure à celle observée par Atkinson *et al.* (1997) sur le chêne). Pour expliquer ce déséquilibre, on peut rappeler que des expériences ont montré une stimulation précoce de la vitesse de croissance en hauteur par un [CO_2] élevé (Vivin *et al.*, 1995 ; Lindroth *et al.*, 2001). Il est fort possible alors que la croissance en hauteur soit trop rapide pour permettre à l'arbre de former dans le même temps ses structures tissulaires secondaires et de se développer en circonférence de façon proportionnelle.

La biomasse foliaire totale a également été stimulée par le fort [CO_2] (+36% par rapport aux valeurs sous [CO_2] ambiant) en fin de saison. Cela peut être lié à l'augmentation du nombre de feuilles par plant, et/ou à l'augmentation de la masse moyenne d'une feuille. Concernant la première hypothèse, on peut souligner le fait que le développement des arbres ayant poussé

sous 680 vpm [CO_2] a été fortement perturbé, avec une disparition de la croissance rythmique au profit d'une croissance continue après le 3ème flush. Donc, sans avoir déterminé sur le terrain le nombre exact de feuilles par plant, on peut supposer que le nombre de feuilles produites sous [CO_2] élevé devait être supérieure à celui sous [CO_2] ambiant (et a dû entraîner un flux de carbone plus élevé vers les racines en particulier).

Concernant la deuxième cause possible d'augmentation de la biomasse foliaire, nous avons trouvé une diminution de la surface foliaire spécifique (SLA) sous fort [CO_2] par rapport au [CO_2] ambiant, significative uniquement pour le second flush (–12.4%). Ce résultat confirme certaines expériences menées sur différentes espèces (Pettersson & McDonald, 1992 ;Guehl *et al.*, 1994 ; Tjoelker *et al.*, 1998a,b ; Norby *et al.*, 1999 ; Tricker *et al.*, 2004 ; Ainsworth & Long, 2005), mais reste inférieur à ce que Vivin *et al.* (1996) et Maillard *et al.* (2001) ont pu trouver sur le chêne. Par contre, nous n'avons trouvé aucune modification significative de la surface foliaire moyenne sous [CO_2] élevé, ce qui s'oppose au résultat obtenu dans de nombreuses expériences ou la surface foliaire tend plutôt à augmenter (Badeck *et al.*, 1997a ; Ceulemans *et al.*, 1999 ; Taylor *et al.*, 2003). Dans notre cas, la diminution de la SLA sous fort [CO_2] pour le flush 2 signifie donc une augmentation de la masse foliaire par unité de surface. Cela est probablement lié à une augmentation en épaisseur de la feuille (Oksanen *et al.*, 2001 ; Tricker *et al.*, 2004), puisque la teneur en eau des feuilles n'a été que très peu modifiée (-3.5% au maximum à 680 vpm [CO_2]) et donc a priori que la densité des feuilles a été peu modifiée.

Le fait que la SLA soit significativement plus basse pour les feuilles du flush 2 soumises à 680 vpm [CO_2] par rapport au [CO_2] ambiant, mais que la différence ne soit plus significative pour le flush 3, contrairement à ce que Vivin *et al.* (1996) et Maillard *et al.* (2001) ont observé sur le chêne, pourrait indiquer une acclimatation précoce de nos chênes à l'élévation du [CO_2]. Dans ce sens, nous avons trouvé une plus grande variabilité intra-famille de la SLA sous [CO_2] élevé par rapport aux données obtenues sous [CO_2] ambiant pour les feuilles du second flush, mais plus pour les feuilles du troisième flush. La variabilité de la réponse des individus au fort [CO_2] semble donc bien réduite à partir du troisième flush, comme s'il y avait une « habituation » des arbres à leur environnement gazeux.

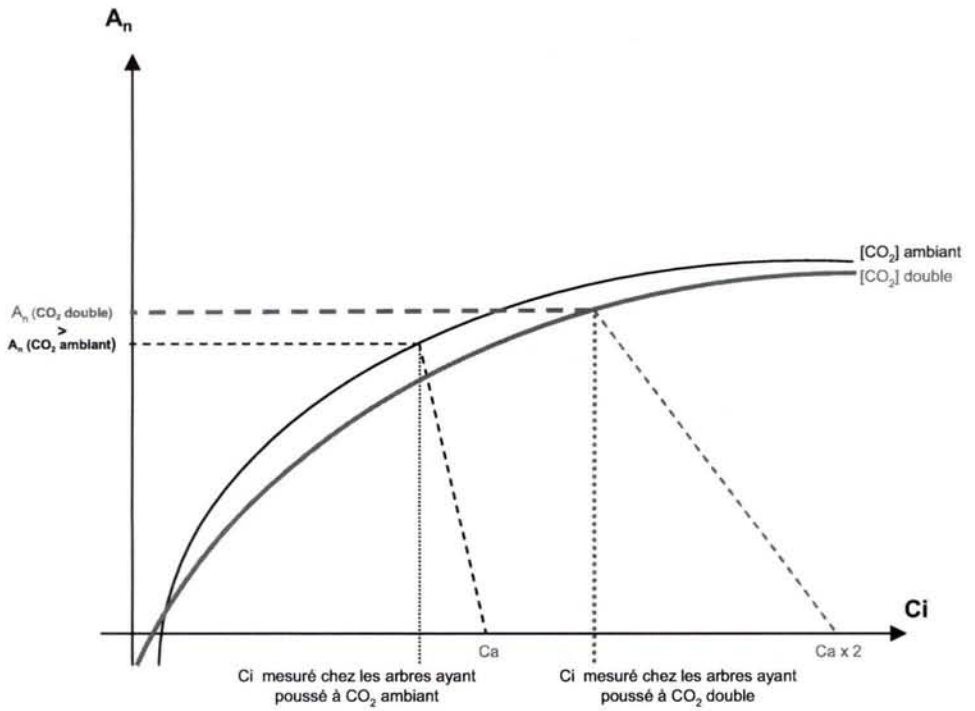


Figure 33 : Modèle de réponse de la relation A/Ci pour des concentrations en CO_2 de mesure ambiante (Ca) et doublée (Ca x 2) (d'après le modèle de Farquhar *et al.*, 1980; Webber *et al.*, 1994 ; Besford *et al.*, 1998).

I.2. Effet du fort [CO_2] sur les échanges gazeux

La première réponse de la physiologie à l'élévation du [CO_2] atmosphérique a été la stimulation de la photosynthèse nette pour les feuilles du flush 1, comme de nombreuses expériences et revues l'ont parfaitement décrit (cf. Synthèse bibliographique). Picon *et al.* (1997) ont trouvé la même tendance avec des variations plus marquées entre les deux traitements [CO_2]. Cette donnée est d'autant plus marquante que la conductance stomatique ne montre aucun changement significatif en réponse au [CO_2] pour le premier flush. Cela signifie que plus de carbone entre par les stomates et se retrouve disponible pour la photosynthèse dans les feuilles.

La stimulation de la photosynthèse par le fort [CO_2] est confirmée pour le second flush (+36%), et est même accentuée par rapport à la première série de mesures. Cette élévation de l'assimilation carbonée nette se produit malgré une diminution significative de plus de 20% de la conductance stomatique à la vapeur d'eau en réponse au [CO_2] élevé. Plusieurs processus peuvent ici être impliqués : (1) malgré une moindre ouverture des stomates, la concentration en carbone entrant dans les feuilles peut être suffisante pour être saturante vis-à-vis de la photosynthèse ; (2) le système photosynthétique – enzymes ou facteurs de la collecte lumineuse – a pu être réorganisé de telle manière à ce que son efficience soit maximale malgré la fermeture progressive des stomates ou (3) la photosynthèse nette est plus élevée sous fort [CO_2] principalement du fait de la diminution des pertes de [CO_2] par la respiration et la photorespiration (Booker *et al.*, 1997 ; Gonzalez-Meler *et al.*, 2004). On peut toutefois présenter une critique de nos mesures d'échanges gazeux, illustrée par la Figure 33.

Le problème qui se pose dans nos mesures est que nous ne comparons pas directement les mesures d'assimilation dans les deux serres, car elles ne sont pas réalisées à la même concentration atmosphérique en [CO_2]. Lorsque l'on trace les courbes théoriques de réponse de l'assimilation à une concentration interne en CO_2 croissante (Farquhar et al., 1980 ; Besford et al., 1998), plusieurs scenarii sont envisageables pour le déplacement de cette courbe lorsque la plante est soumise à une concentration élevée en [CO_2] atmosphérique (Webber *et al.*, 1994). Le plus fréquemment, on observe une diminution du point de compensation au Ci sous fort [CO_2] (Pettersson & McDonald, 1992 ; Kubiske & Pregitzer, 1996). L'assimilation maximale (plateau) montre plus de variabilité sous fort [CO_2] (Pettersson & McDonald, 1992 ; Le Thiec & Dixon, 1996 ; Rey & Jarvis, 1997). Nous savons enfin que la conductance stomatique est plus basse sous fort [CO_2] que sous [CO_2] ambiant. Malgré l'ensemble de ces limitations de la

photosynthèse, on voit que, même si la photosynthèse maximale est abaissée, c'est effectivement la valeur du [CO_2] atmosphérique qui fait que la concentration interne en CO_2 sera suffisante pour se situer presque au niveau du plateau de photosynthèse, alors que les individus soumis à un [CO_2] ambiant seront encore au niveau de la zone de réponse croissante de la photosynthèse à l'élévation du Ci. En résumé, si les échanges gazeux avaient été mesurés dans notre expérience à une même concentration en CO_2 pour tous les individus, l'assimilation carbonée devrait être plus basse chez les individus ayant poussé sous fort [CO_2] que sous [CO_2] ambiant si la photosynthèse avait effectivement subit un phénomène d'acclimatation.

L'assimilation nette cesse par contre d'être stimulée par le fort [CO_2] à partir du troisième flush. Cela suggère qu'une acclimatation de la photosynthèse au [CO_2] élevé a dû se produire lors de la mise en place du 3ème flush. La limitation du développement racinaire et les carences minérales n'étant a priori pas impliquées dans ce phénomène, on peut supposer que l'accumulation de sucres dans les feuilles incriminée lors des problèmes de relations sources-puits (Paul & Pellny, 2003) peut peut-être intervenir ici pour justifier l'acclimatation. Une autre solution serait donc que l'organisme lui-même ait réajusté son système photosynthétique afin de le rendre plus efficient et de maintenir la photosynthèse à un niveau équivalent à celui des arbres poussant sous [CO_2] ambiant. Nous reviendrons par la suite sur cette éventuelle réorganisation du système photosynthétique avec la distribution de l'azote entre les différents acteurs de ce système. Une autre hypothèse serait qu'il y a une augmentation des pertes de carbone par la respiration et la photorespiration, en diminuant ainsi au final le bilan photosynthétique.

Nous n'avons pas trouvé de preuve de l'augmentation de la photorespiration sous [CO_2] élevé, sachant que les activités *in vitro* des enzymes liées au cycle photorespiratoires n'étaient pas modifiées par le fort [CO_2] dans le flush 2, et tendaient au contraire à diminuer dans les feuilles du 3ème flush. Concernant la respiration, nous n'avons pas effectué de mesures pour estimer sa valeur, mais il semblerait qu'elle diminue sous [CO_2] élevé dans les expériences menées sur les arbres (Mousseau *et al.*, 1996 ; Norby et al., 1996,1999 ; Curtis & Wang, 1998 ; Idso, 1999). Enfin, une dernière solution pour expliquer l'acclimatation de la photosynthèse serait que l'écart de conductance stomatique entre fort [CO_2] et [CO_2] ambiant soit encore plus réduit pour les feuilles du flush 3, de telle manière à ce que le rapport entre le Ci (concentration interne en CO_2) et le Ca (concentration atmosphérique) soit finalement le même pour les feuilles des deux serres.

En effet, à l'inverse de la photosynthèse, la conductance ne présente pas d'acclimatation au fort [CO_2] et la différence entre les deux serres s'accentue encore au cours du 3ème flush jusqu'à ce que la conductance soit diminuée presque de moitié sous fort [CO_2], même si elle tend à se réduire en fin de saison. Cette observation a été faite dans de nombreuses expériences (Beerling, 1996 ; Picon *et al.*, 1997 ; Bettarini *et al.*, 1998 ; Johnson et al., 2002) avec des variations souvent du même ordre de grandeur que dans notre expérience – 30 à 40% de réduction de la conductance sous fort [CO_2] (Eamus & Ceulemans, 2001 ; Medlyn *et al.*, 2001). Cependant, d'autres expériences n'ont pas montré de variation de la conductance stomatique au fort [CO_2] (Norby *et al.*, 1996 ; Curtis & Wang, 1998 ; Greenep *et al.*, 2003, Norby *et al.*, 2003), y compris sur des chênes pédonculés (Bunce, 1992 ; Picon *et al.*, 1996b).

L'hypothèse selon laquelle la conductance serait réduite spécifiquement pour retrouver un ratio Ci/Ca stable a été posée par Ehleringer & Cerling (1995) et Marshall & Monserud (1996), et a été confirmée par des analyses réalisées à très long terme (Liu & Teskey, 1995 ; Beerling, 1996 ; Nguyen-Tu *et al.*, 2004 ; Saurer *et al.*, 2004), et semblerait être confirmée également par notre expérience. Nous avons donc estimé la valeur du rapport Ci/Ca pour les différentes dates, et nous avons trouvé que ce rapport augmentait significativement au cours du temps pour les plants témoins, d'une valeur de 0.79 pour la date t1 vers une valeur de 0.88 à t5, ce qui ne semble pas compatible avec l'hypothèse de stabilisation de ce rapport par la plante. Par contre, le rapport Ci/Ca était significativement plus élevé (+5.7%) à 680 vpm [CO_2] qu'à 380 vpm [CO_2] uniquement pour le flush 1. Pour les flushs 2 et 3, la différence entre les deux traitements [CO_2] a été beaucoup plus réduite, ce qui nous amène à penser que si il existe une régulation active des flux de CO_2 dans la feuille, elle se produit essentiellement vis-à-vis de changements extérieurs qui peuvent intervenir sur le rapport Ci/Ca plutôt que sur des variations de ce dernier liées au développement foliaire seul.

Comme certains auteurs le suggéraient (Woodward, 1993 ; Woodward & Kelly, 1995), des analyses de densité stomatique devraient bientôt être effectuées sur nos échantillons. Cependant, il semblerait que la modification de la densité des stomates en réponse à l'élévation du [CO_2] atmosphérique ne soit visible que sur un très long terme (Woodward 1987, 1993) plutôt que sur des périodes d'étude courtes (quelques années) pour lesquels on n'observe généralement pas de diminution de la densité de stomates (Radoglou & Jarvis, 1990b ; Guehl *et al.*, 1994 ; Bettarini *et al.*, 1998 ; Reddy *et al.*, 1998 ; Lodge *et al.*, 2001 ; Herrick *et al.*, 2004).

I.3. Effet du [CO_2] sur la discrimination isotopique des feuilles et de la cellulose

Les valeurs de discrimination obtenues à partir des feuilles sont plus élevées que celles trouvées par Guehl *et al.* (1994) sur des jeunes germinations de chênes. Les mesures sur la cellulose correspondent par contre relativement bien à celles que Ponton *et al.* (2001) ont obtenues sur des chênes adultes.

Un premier constat peut être fait sur la corrélation entre les données de discrimination obtenues à partir des feuilles et celles de la cellulose, qui sont relativement bien corrélées entre elles indépendamment de la concentration atmosphérique en CO_2. La pente de la droite de corrélation est effectivement proche de celle de la bissectrice, i.e. que la différence entre les deux serres pour un même génotype est relativement constante, que sa discrimination initiale ait été faible ou élevée. La discrimination mesurée sur les feuilles du flush 3 s'est toutefois avérée plus élevée que dans la cellulose du bois qui intègre les discriminations des flushs 2 et 3. La différence d'intégration au niveau du temps pourrait être une première cause expliquant cet écart. La discrimination mesurée sur les feuilles correspond uniquement à l'assimilation carbonée durant le flush 3, durant lequel l'ouverture stomatique a été supérieure à celle du flush 2 et donc pendant lequel la discrimination a due être plutôt stimulée contre le ^{13}C. Une autre cause possible de l'écart de discrimination entre feuilles et cellulose peut être liée au fait que l'on ne supprime pas la lignine des feuilles comme on l'a fait pour le bois avant de faire l'analyse de discrimination. En effet, la signature isotopique de ce composé est plus négative que pour les composés carbonés sucrés, c'est-à-dire que la lignine est davantage appauvrie en ^{13}C que les sucres (Brendel *et al.*, 2003). Malgré tout, la corrélation trouvée entre les discriminations des deux tissus fait que l'on peut se baser sur l'un ou l'autre pour commenter les effets du [CO_2] élevé sans avoir de différences dans les réponses.

La discrimination isotopique mesurée n'a pas montré de variation moyenne au niveau de la femille entre les deux traitements [CO_2], comme l'avaient déjà observé sur différentes variétés de chênes Picon *et al.* (1997) et Nguyen-Tu *et al.* (2004) dans des expériences à relativement court terme, en comparaison aux expériences menées sur de très longues durées (sur des dizaines d'années voire des centaines d'années) qui ont révélé tantôt une élévation de la discrimination au cours du temps en parallèle à l'évolution du [CO_2] atmosphérique (Beerling & Woodward, 1995 ; Penuelas & Estiarte, 1997), tantôt une diminution de sa valeur (Duquesnay *et al.*, 1998 ; Ponton *et al.*, 2001). Il est donc possible que, sur une courte échelle de temps, la discrimination

ne varie pas de manière suffisamment sensible en réponse au [CO_2] pour que cette variation puisse être détectée. La distribution de la population triée en fonction des valeurs de discrimination n'a pas montré de variation dans les rangs des individus entre les deux traitements [CO_2] malgré une plus grande fourchette de valeurs de discrimination sous [CO_2] élevé que sous [CO_2] ambiant. Cela s'ajoute à la corrélation significative qui existe entre les valeurs de discrimination des deux traitements [CO_2], et montre que l'élévation du [CO_2] atmosphérique permet à la diversité génétique de s'exprimer de façon plus nette, mais sans modification radicale des comportements des individus. Ceci avait d'ailleurs été déjà signalé sur le pin maritime par Flanagan & Johnsen (1995) qui avaient retrouvé une certaine stabilité dans l'expression de la discrimination sur plusieurs années et dans des conditions environnementales variables.

I.4. Effet du fort [CO_2] sur l'efficience d'utilisation de l'eau

A partir des échanges gazeux, on a pu estimer que l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque était très nettement supérieure sous [CO_2] élevé par rapport à sa valeur sous [CO_2] ambiant, et est quasiment doublée dès le deuxième flush dans les feuilles soumises à 680 vpm [CO_2], ainsi que beaucoup d'expériences l'ont montré en particulier sur les chênes (Guehl *et al.*, 1994 ; Picon *et al.*, 1997 ; Lodge *et al.*, 2001). Contrairement à ce que Pettersson & McDonald (1992) ont trouvé dans leur expérience sur le bouleau, la meilleure efficience est majoritairement liée à la baisse de la conductance sous fort [CO_2] (et non à l'augmentation de la photosynthèse) excepté pour le flush 1 ou la valeur de WUE à 680 vpm [CO_2] est « seulement » supérieure de 15.4% aux valeurs à 380 vpm [CO_2]. Si l'on regarde la répartition de la population par rapport aux valeurs de WUE, on s'aperçoit que les rangs ne sont pas forcément conservés entre les deux traitements [CO_2] aux cinq dates de mesures, et ceci peut être expliqué par le fait que la réponse de la photosynthèse et de la conductance stomatiques ne varient pas de manière parallèle dans le temps pour tous les génotypes, de même que tous les génotypes ne répondent pas forcément de manière identique à l'élévation du [CO_2] atmosphérique, et que le rapport entre assimilation et conductance induit à lui seul une grande variabilité de réponses au niveau de la population.

Les valeurs obtenues à partir des mesures de discrimination isotopique (coefficient b standard) sont du même ordre de grandeur que celles trouvées pour les échanges gazeux. Si l'on compare les données de discrimination calculées à partir des échanges gazeux avec l'équation qui permet

Efficience d'utilisation de l'eau (WUE) :

$$\int_t \underbrace{\frac{An}{gs}}_{\text{Intrinsèque}} = \underbrace{\frac{Ca}{1,6} * \frac{(b-\Delta)}{(b-a)}}_{\text{Intégrée sur le temps}}$$

avec $A_n / g_s = C_a / 1,6 * (1 - C_i / C_a)$

C_i : concentration intercellulaire en CO_2 ($Ci = Ca - 1,6 . A/g_s$)

Liaison Échanges gazeux / $\Delta^{13}C$ (modèle de Farquhar *et al.*, 1982)

$$\Delta\ (‰) = a + (b - a) * C_i / C_a$$

a : fractionnement isotopique lié à la conductance stomatique
(a = 4,4 ‰)

b : fractionnement isotopique lié à l'assimilation carbonée *via* les carboxylases
(b = 27 ‰)

de calculer l'efficience d'utilisation de l'eau à partir de la discrimination, on voit que pour des valeurs de discrimination Δ stables entre les deux traitements [CO_2], la plus forte efficience d'utilisation de l'eau calculée sous [CO_2] élevé est expliquée par la différence entre Ca et Ci. Celle-ci est liée à la variation de la concentration atmosphérique en CO_2, Ca, sans qu'il y ait de variation du rapport Ca/Ci entre les deux serres (Ca/Ci = 0.88). Ce constat va dans le sens des conclusions de Duquesnay *et al.* (1998) sur la cellulose du bois de bouleau, et de Picon *et al.* (1997) sur le chêne pédonculé.

I.5. Effet du fort [CO_2] sur le système photosynthétique

La composition foliaire du flush 3 en carbone et azote a été significativement modifiée par le traitement [CO_2], avec une diminution de la concentration en azote surtout lorsque la quantité d'azote est exprimée par unité de masse sèche (–12% d'azote par unité de masse sous fort [CO_2] par rapport aux arbres témoins). Ceulemans *et al.* (1999) avaient signalé le fait que le mode d'expression de la teneur en azote pouvait jouer sur les différences observées entre les traitements [CO_2], mais ils signalaient en plus que la surface foliaire étant souvent plus élevée sous fort [CO_2], la quantité d'azote exprimée par unité de surface aurait plutôt tendance à augmenter sous fort [CO_2]. La teneur en azote des feuilles n'est que faiblement corrélée aux mesures d'échanges gazeux et l'est surtout avec l'assimilation carbonée (moins de 10% de la valeur expliquée). La corrélation est positive entre la teneur en azote et les échanges gazeux – assimilation et conductance- dans la mesure instantanée à t5, alors qu'elle est négative lorsque l'on corrèle la teneur en azote aux mesures moyennes d'échanges gazeux sur l'année. Ces corrélations indiquent certainement la présence de la Rubisco et dans une moindre mesure aux pigments photosynthétiques, qui sont à la fois très fortement corrélés à la quantité d'azote dans les feuilles et de façon plus limitée (mais toujours positive) à l'assimilation carbonée.

Si l'on s'intéresse à la proportion d'azote investie dans les principaux acteurs du système photosynthétique, on voit que certaines réorganisations se produisent dans la feuille sous fort [CO_2] et tendent à rediriger l'azote vers d'autres cibles que la photosynthèse. Par contre, on trouve de bonnes corrélations entre les quantités de protéines ou de Rubisco et la quantité d'azote dans les feuilles, plus importantes à 680 vpm [CO_2] qu'à 380 vpm [CO_2] ce qui signale une réorganisation simultanée de ces différents éléments qui se produit de manière plus importante sous fort [CO_2] que dans les feuilles « témoins ».

A l'inverse de l'azote, la concentration en carbone augmente très légèrement mais significativement (probablement du fait de la faible variabilité entre les génotypes) sous fort [CO_2], avec un rapport C/N final de 15.7% supérieur dans les feuilles à 680 vpm [CO_2] en comparaison aux feuilles soumises à 380 vpm [CO_2], ainsi que constaté de nombreuses expériences (ex. Vivin *et al.*, 1996 ; Lindroth *et al.*, 2001 ; Kruse *et al.*, 2003), selon le phénomène de « dilution » de l'azote.

Les concentrations en protéines trouvées dans les feuilles sont plus faibles mais du même ordre de grandeur que celle dosées par George *et al.* (1996) et Schmadel-Hagebölling *et al.* (1998) sur des chênes. La quantité de protéines totales est toujours plus basse dans les feuilles des arbres élevés sous 680 vpm [CO_2] que sous 380 vpm [CO_2], de façon plus nette par unité de masse foliaire que par unité de surface foliaire, et de manière plus significative dans le flush 2 que dans le flush 3.

La quantité de protéines solubles montre également une diminution sous fort [CO_2], mais moins nette que pour les protéines totales. La différence entre protéines totales et solubles peut laisser penser que les feuilles des arbres soumis à un [CO_2] élevé vont surtout réorganiser leur structure profonde, à savoir l'organisation des protéines membranaires, ce qui pourrait être à l'origine de la diminution de la concentration en azote foliaire. Les teneurs en protéines solubles et totales exprimées par gramme d'azote ne sont pas différentes entre les deux serres, mais nous ne possédons que la valeur pour le flush 3 qui ne montrait quoi qu'il en soit pas de variation significative des concentrations en protéines. Lorsque l'on compare les teneurs en protéines solubles et totales (Figure 18), on peut voir que sous 680 vpm [CO_2], la quantité de protéines solubles représente presque la totalité des protéines totales. On peut d'ores et déjà soupçonner un artefact de mesure dans ce résultat, mais cela montre tout de même que les protéines membranaires sont particulièrement remobilisées sous fort [CO_2].

Cette diminution de la quantité de protéines sous fort [CO_2] est trouvée dans de nombreuses expériences (George *et al.*, 1996 ; Gleadow *et al.*, 1998 ; Ludewig *et al.*, 1998 ; Schmadel-Hagebölling *et al.*, 1998 ; Schwanz & Polle, 2001 ; Vu, 2005), et est en général reliée à la diminution de la quantité de Rubisco qui est la protéine la plus représentée dans les feuilles (Fangmeier & Jäger, 1998).

Dans notre expérience, la concentration en Rubisco est significativement plus basse dans les feuilles à 680 vpm [CO_2] qu'à 380 vpm [CO_2], d'environ 21% pour les deux flushs lorsqu'elle est exprimée par unité de surface (ainsi que Ainsworth & Long, 2005, l'ont rapporté dans leur méta-analyse), et de –30 et –25% respectivement pour les flushs 2 et 3 lorsqu'elle est exprimée par unité de masse sèche. Les valeurs de concentrations sont visiblement faibles par rapport à celles qu'ont pu trouver sur d'autres espèces Warren *et al.* (2003) mais très fortes par rapport à d'autres expériences (Tissue *et al.*, 1993 ; Schmadel-Hagebölling *et al.*, 1998). Exprimée par gramme de protéines solubles ou totales, on peut voir que la quantité de Rubisco diminue plus fortement que le reste des protéines (ce qui est encore plus visible par gramme de protéines totales), ce qu'avaient également trouvé Stitt & Krapp (1999), et qui semble confirmer le fait que la diminution de la quantité de protéines foliaires soit en grande partie due à la diminution de la quantité de Rubisco. On peut également voir que si la diminution de la quantité de Rubisco par unité de surface ou de masse observée sous fort [CO_2] est moindre dans les feuilles du flush 3 que dans celle du flush 2, la diminution de sa quantité exprimée par gramme de protéines totales ou solubles est au contraire aggravée dans le flush 3. Taylor *et al.* (2005) rappellent à ce sujet que l'expression génétique de la Rubisco tend à diminuer en fin de saison, et que cet effet peut interagir avec l'effet plutôt positif pour eux que le fort [CO_2] peut avoir sur la production de Rubisco.

En plus de la diminution de la quantité de Rubisco, ses activités initiales et totales spécifiques sont plus basses dans les feuilles exposées à un fort [CO_2] que pour les témoins, de même que le pourcentage d'activation de l'enzyme, ce qu'ont également constaté plusieurs auteurs (Bowes, 1996 ; Sicher & Kremer, 1996 ; Li *et al.*, 2002 ; Luomala *et al.*, 2003). Toutes ces données montrent une forte réassimilation de l'azote contenu dans les enzymes de Rubisco qui étaient probablement en excès dans les feuilles à 380 vpm [CO_2], mais dont la diminution de la concentration ne nuit pas à l'assimilation carbonée finale comme le pressentait Long (1991). Sous fort [CO_2], la concentration de l'enzyme est donc plus faible, et la diminution de son activation peut signifier que la feuille a encore une marge dans l'utilisation de son pool de Rubisco qu'elle n'optimise pas complètement. On pourrait alors s'attendre à ce que la capacité photosynthétique (Vcmax, capacité de carboxylation maximale) des feuilles soit diminuée sous fort [CO_2], ainsi que Le Thiec & Dixon (1996) l'avaient constaté sur l'épicéa de Norvège et le chêne rouge, ainsi que Rey & Jarvis (1997) sur le bouleau.

Si l'on s'intéresse par contre à l'activité de la Rubisco *in vivo* exprimée par mg de Rubisco, on ne trouve par contre plus de variation significative de sa valeur entre les deux traitements [CO_2], ce

qui semble indiquer que la même proportion en Rubisco est active et impliquée dans le processus de photosynthèse, quel que soit l'environnement. On peut aussi penser que la concentration en [CO_2] est telle dans le milieu cellulaire que la Rubisco est toujours saturée par la molécule lorsque les feuilles sont placées à 680 vpm [CO_2].

Lors d'une élévation du [CO_2] atmosphérique, il est également très probable que l'activité oxygénasique de la Rubisco soit fortement inhibée, ce qui induirait un ralentissement de la photorespiration. On n'observe aucune variation significative des activités spécifiques de la glycolate oxydase et de l'hydroxypyruvate réductase dans le flush 2, mais leur activité diminue par contre de façon significative de 20 à 30 % dans les feuilles du flush 3 soumises au fort [CO_2]. Cette diminution de l'activité tardive semble corrélée à la diminution de la quantité de Rubisco qui est alors plus rapidement saturée par le [CO_2]. Le métabolisme azoté primaire adjacent à la photorespiration, caractérisé par l'activité de la glutamine synthétase, est lui aussi inchangé durant le flush 2, mais ralenti dans les feuilles du flush 3 lorsqu'elles sont placés sous [CO_2] élevé. Si l'on considère que l'azote provenant de la photorespiration est la principale source utilisé pour le métabolisme des acides aminés, et si l'on considère que l'azote provenant de la rubisco et des antennes collectrices de lumière est recyclé dans d'autres protéines, on peut imaginer effectivement que le métabolisme azoté de la glutamine synthétase a pu être ralenti, comme l'ont supposé Bertoni & Becker (1996) et Schmadel-Hagebölling *et al.* (1998).

L'activité de la seconde enzyme carboxylasique, la PEPc ne semble pas contre pas être modifiée significativement par l'élévation du [CO_2] atmosphérique, malgré une très légère baisse de son activité, comme l'avaient observé Besford & Hand (1989), Yelle *et al.* (1989) et Ferrario-Mery *et al.* (1997). Toute cette partie du métabolisme carboné dans le cytosol, consécutive à la photosynthèse et impliquée dans le cycle des acides tricarboxyliques, n'est donc en apparence pas touchée par le fort [CO_2] alors que la photosynthèse, la photorespiration et l'assimilation azotée le sont. Il serait donc intéressant de savoir si la glycolyse, intermédiaire entre la photosynthèse et la voie anaplérotique de fixation du carbone, est modifiée ou non par le [CO_2] élevé.

Le rôle des sucres sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la Rubisco a souvent été rapporté (Stitt, 1991 ; Van Oosten *et al.*, 1994 ; Webber *et al.*, 1994 ; Smeekens & Rook, 1997 ; Liozon *et al.*, 2000). Nous avons dosé le saccharose dans notre étude, et il s'avère que la production de saccharose est fortement stimulée sous fort [CO_2] dans le flush 2 (+79% et

+57% respectivement pour les concentrations exprimées par unité de surface et unité de masse), alors qu'elle est significativement réprimée dans le flush 3 (-23% et –29% pour les feuilles soumises au fort [CO_2]). Il est difficile de savoir si la diminution de la teneur en saccharose dans le flush 3 est une cause de la rétrorégulation de la quantité et/ou l'activité photosynthétique, ou si elle est une conséquence de la réorganisation de l'azote dans le système photosynthétique, les deux processus étant de fait dépendants l'un de l'autre.

L'azote contenu dans la Rubisco en temps normal ne semble pas être redirigé pour autant vers le système de collecte lumineuse sous fort [CO_2], car on trouve également une diminution de la quantité de pigments photosynthétiques d'approximativement 10 à 20% par unité de surface et unité de masse sèche foliaire dans le flush 2 (les variations étant moins importantes mais toujours significatives dans le flush 3). Comme pour les protéines et la Rubisco, les concentrations en pigments et en azote sont corrélées de manière significative et cette corrélation est légèrement plus importante sous [CO_2] élevé que sous [CO_2] ambiant, indiquant que les pigments sont probablement impliqués dans le même processus de réorganisation du système photosynthétique que la Rubisco. Epron *et al.* (1996) avaient trouvé à ce sujet-là une diminution de la quantité de pigments exprimée par gramme d'azote, ce qui montre que l'investissement azoté diminue pour les principaux facteurs des systèmes photosynthétiques. Badeck *et al.* (1997a) trouvent à l'inverse une légère augmentation de la quantité de chlorophylles par unité de surface foliaire lorsque les châtaigniers et les hêtres qu'ils étudiaient étaient correctement fertilisés. Jach & Ceulemans (1997) ne trouvent pas non plus de variation de la concentration en pigments par unité de surface foliaire.

On a également noté une augmentation de près de 15.2% dans le flush 2 et 9.3% dans le flush 3 du rapport entre les chlorophylles a et b dans les feuilles, ainsi que l'avaient trouvé Kalina *et al.* (1997) sur l'épicéa. Selon eux, cela sous-entendrait une diminution de la quantité de récepteurs lumineux II (LHC II = Light Harvesting Complex II), plus riches en chlorophylle b que les LHC I, ce qui signifie que le système même de transport des électrons peut être aussi modifié par le [CO_2] élevé. Cependant, cette variation du rapport entre Chlorophylles a et b n'est pas systématique dans les expériences, et plusieurs autres expériences ne montrent pas de variation significative du rapport malgré l'augmentation du [CO_2] atmosphérique (Besford & Hand, 1989 ; Jach & Ceulemans, 1997).

II. QTLs DETECTES POUR LES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES ET LEURS REPONSES AU [CO_2] ELEVE

Afin de ne pas alourdir la discussion, les QTLs détectés seront présentés en fonction des différents intérêts que leur localisation apporte pour l'étude, puis du groupe de liaison sur lesquels ils sont localisés (voir Annexe 9 pour les différents groupes).

II.1. Détection de QTLs stables pour un caractère donné

Par QTL stable, on entend un QTL qui est détecté à plusieurs dates différentes, voire dans plusieurs expériences menées sur la même famille. Un QTL peut être aussi considéré comme stable dans la famille lorsqu'il est retrouvé à la fois sur la carte mâle et la carte femelle.

Peu de QTLs significatifs ont été ainsi détectés dans notre expérience avec une grande stabilité dans les résultats.

L'exemple le plus marquant est sans doute la discrimination isotopique contre le ^{13}C dont les QTLs localisés sur les groupes de liaison 2 et 11 des deux cartes parentales et sur le groupe de liaison 8 de la carte génétique mâle. Ils ont été détectés pour les deux types de tissus (feuille et cellulose du bois), et pour les deux environnements [CO_2]. La plupart des QTLs trouvés ici sont significatifs, et ont été détectés également dans une autre expérience menée sur 278 génotypes de la même famille dans une pépinière en plein-champ de la région de Bourran (sud-ouest de la France), avec 5 répétitions effectuées pour chaque génotype (Brendel *et al.*, en préparation). L'étude en question a été menée plusieurs années de suite, et les QTLs liés à la discrimination ont été détectés pour les groupes de liaison 8 et 11. Le nombre d'individus étudié n'est pas du même ordre de grandeur que les expériences sur les lignées isogéniques des herbacées, mais nous pouvons tout de même prétendre que les QTLs détectés pour la discrimination isotopique sont des QTLs forts, mais n'expliquent pas la totalité de la variabilité phénotypique observée.

Aucun autre caractère n'a montré une telle stabilité, et soit la significativité des différents QTLs liés au caractère est insuffisante, soit différents QTLs très significatifs ont été détectés, mais sur des groupes de liaison différents. Le principal problème soulevé dans notre expérience est la difficulté de détecter des QTLs et de les caractériser avec certitude lorsque le nombre de génotypes et de répétitions sont limités à la base. Certains des QTLs détectés par ces analyses

sont très certainement des QTLs stables, mais le petit nombre d'individus testés fait que le QTL ne sera pas forcément détecté si son effet est trop faible sur le caractère. De plus, certains caractères sont sujets à de si nombreuses variables environnementales et physiologiques que le QTL peut être encore plus difficile à détecter.

Pour les échanges gazeux, la variabilité liée à l'expérimentation en elle-même est déjà très élevée, et il faudrait un nombre de répétition très élevé pour chaque génotype pour pouvoir déterminer des QTLs avec précision, d'autant plus qu'un caractère comme la photosynthèse est déterminé et régulé par un très grand nombre de molécules et de processus métaboliques, ce qui multiplie a priori le nombre de QTLs à détecter et risque de faire diminuer leurs importances respectives.

II.2. Détection de QTLs par analyse Multi-Environnementale (ME-QTLs)

Un second intérêt dans l'analyse de QTLs est de déterminer si un caractère donné est déterminé par un ou plusieurs QTLs qui sont détectables dans différentes conditions environnementales. Dans la plupart des cas, les QTLs détectés par cette analyse sont des QTLs significatifs qui ont été trouvés pour une seule concentration en CO_2 par analyse simple, et éventuellement dont un QTL putatif avait été détecté dans la même région du groupe de liaison.

Un QTL significatif a ainsi été trouvé sur le LG1 de la carte mâle pour la teneur en azote par unité de masse sèche, détecté uniquement pour les valeurs à 380 vpm [CO_2] en analyse simple. La surface foliaire spécifique (SLA) des feuilles du flush 3 est également déterminée par un ME-QTL sur le LG3 de la carte mâle. A deux reprises de tels QTLs ont été également détectés pour la teneur en caroténoïdes, sur le LG5 mâle pour la concentration exprimée par unité de surface et sur le LG7 femelle pour la concentration par unité de masse sèche.

Dans d'autres cas, la puissance de l'analyse multi-environnementale (liée au fait que le jeu de donné est multiplié par le nombre d'environnements testés) fait que l'on détecte des QTLs qui n'étaient pas sortis avec l'analyse simple seule. Ainsi, un QTL significatif a été trouvé pour la quantité de Rubisco exprimée par gramme de protéines totales du flush 3 sur le LG2 de la carte femelle, qui colocalise d'ailleurs avec un QTL multi-environnemental putatif lié à la quantité de Rubisco exprimée cette fois par gramme de masse sèche et les QTLs putatifs associés issus de l'analyse simple. Sur le LG2 de la carte mâle, c'est un ME-QTL significatif pour la masse sèche finale totale qui a été ainsi détecté, ainsi que pour la Glycolate oxydase dans les feuilles du second flush sur le LG5 de la carte femelle.

Il y a d'autres exemples de ces ME-QTLs mais les présenter tous n'aurait pas de réel intérêt. En revanche, l'analyse multi-environnementale nous fournit un autre outil qui est le test des effets du QTL en fonction des environnements. Sur l'ensemble des données traitées, le nombre de QTLs significatifs dont l'effet varie significativement en fonction de la concentration en CO_2 atmosphérique est relativement réduit.

Après analyse multi-environnementale, on trouve en particulier :

- Un QTL pour le diamètre final du tronc sur le LG12 de la carte mâle, dont l'effet positif sur le caractère diminue significativement sous fort [CO_2] ainsi que le pourcentage de variance expliquée.
- Un QTL pour le SLA des feuilles du troisième flush, localisé sur le LG3 de la carte mâle et dont l'effet négatif ainsi que le PEV sont significativement renforcé sous fort [CO_2] pour la surface foliaire spécifique.
- Un QTL pour l'assimilation nette à la date t3, dont l'effet négatif est significatif uniquement à 380 vpm [CO_2] et dont la variance expliquée presque nulle sous 680 vpm [CO_2].
- Trois QTLs pour l'efficience d'utilisation de l'eau calculée à partir des mesures de discrimination isotopique de la cellulose (sur les LG9 de la carte mâle et le LG4 de la carte femelle) ou des feuilles (sur le LG8 de la carte mâle) et dont les effets sont tous négatifs et renforcés significativement sous fort [CO_2].
- Un QTL localisé sur le LG9 mâle, lié à la quantité de protéines totales par unité de masse sèche dans le flush 2, dont l'effet négatif est significatif uniquement sous fort [CO_2].
- Un QTL pour la quantité de Rubisco exprimée par gramme de protéines totales pour le flush 3, localisé sur le LG2 de la carte femelle, et qui présente une inversion de son effet (positif à 380 vpm [CO_2] et négatif à 680 vpm [CO_2]) entre les traitements.
- Un QTL associé à l'activité de la PEPc dans les feuilles du troisième flush, situé sur le LG8 de la carte femelle et dont les effets sont inversés entre les deux serres (effet négatif à 380 vpm [CO_2] et positif à 680 vpm [CO_2]).
- Deux QTLs associés au même caractère, la concentration en caroténoïdes par unité de masse sèche dans le flush 3, sur les LG7 et LG9 de la carte femelle, et dont les effets sont significatifs uniquement négatif sous fort [CO_2] (effet négatif pour le premier QTL, et effet positif pour le second), les deux QTLs expliquant 20.9% de la variance observée sous fort [CO_2], et rien à [CO_2] ambiant.

II.3. Colocalisation de QTLs associés à des caractères physiologiques liés

Nous utilisons ici le terme de « colocalisation » pour des QTLs en réalité localisés de façon proche l'un de l'autre, et sur un même intervalle de marqueurs (puisque ce sont ces intervalles qui ont servi de référence pour la recherche de QTLs). La précision de la localisation n'est donc pas suffisante pour déterminer si il s'agit d'un même locus, mais nous indique tout de même que les deux QTLs sont suffisamment proches pour que les évènements de recombinaison génétique n'ai pas lieu fréquemment. Cela peut signaler la présence d'une région génomique liée au fonctionnement physiologique de la plante (avec une suite de traits fonctionnels liés).

A plusieurs reprises, des colocalisations se produisent entre caractères liés par leur unité de mesure, comme la surface foliaire spécifique et la teneur en azote foliaire par unité de masse sèche des feuilles du flush 3 sur le LG3 mâle, ou bien par un lien direct comme pour les protéines totales et la Rubisco exprimées par unité de surface foliaire sur le LG1 de la carte femelle. Il est difficile dans ces cas-là de tirer une conclusion sur la colocalisation ou à l'inverse l'absence de colocalisation entre les deux traits.

Sur le groupe de liaison 1 de la carte femelle, une colocalisation entre un QTL significatif pour la quantité de protéines et deux QTLs putatifs pour la Rubisco et l'efficience d'utilisation de l'eau .

Pour le groupe de liaison 2 de la carte femelle, des colocalisations sont trouvées entre d'une part des ME-QTLs putatifs pour la discrimination isotopique de la cellulose, la WUE calculée à partir de la discrimination de la cellulose, des QTLs putatifs simples pour la discrimination des feuilles et de la cellulose, ainsi que de la teneur en azote foliaire du flush 3 et la quantité de chlorophylles dans le flush 2 sous [CO_2] élevé, et un QTL significatif pour la teneur en protéines totales dans le flush 2 sous [CO_2] élevé. On visualise ici des liens dans la régulation de l'azote foliaire dans les systèmes photosynthétiques sous fort [CO_2]. Saintagne *et al.* (2004) et Scotti-Saintagne *et al.* (2004), qui ont travaillé sur la même famille de chênes pédonculés, ont détecté plusieurs QTLs liés à la phénologie des plants ainsi qu'à la morphologie foliaire dans la même zone du groupe de liaison. On peut alors se demander si cela correspond à une réelle colocalisation des QTLs, c'est-à-dire à la présence d'un élément de régulation commun (comme le développement de la surface de réception de la lumière pour les arbres) ou si cela correspond à une simple liaison physique entre les QTLs.

Toujours pour les deux groupes de liaison 2, un ensemble de QTLs sont colocalisés au niveau d'un marqueur retrouvé dans les deux cartes génétiques parentales (ssrQrZAG87), et qui permettent la comparaison des QTLs détectés à leur proximité. C'est ainsi que l'on trouve une colocalisation de QTLs significatifs pour la biomasse finale totale en multi-environnement sur la carte mâle, la quantité de protéines totales exprimée par m2 dans les feuilles du flush 2 et sous $[CO_2]$ ambiant, et 4 QTLs putatifs liés à la biomasse finale de tiges sur la carte mâle, la discrimination des feuilles à $[CO_2]$ ambiant , le SLA en multi-environnement et la quantité de protéines totales par unité de masse sèche pour le flush 2 en multi-environnement sur la carte femelle. L'ensemble de ces QTLs qui correspondent plutôt à des données de flush 2, pourrait signaler un QTL ou un ensemble de QTLs associés à la variabilité intraspécifique de la croissance et du développement foliaire des individus.

Sur le groupe de liaison 4 de la carte femelle, ce sont deux QTLs (un QTL simple et un ME-QTL) significatifs qui sont liés à la discrimination isotopique de la cellulose qui colocalisent avec deux QTLs putatifs pour l'assimilation carbonée moyenne sur l'ensemble des mesures effectuées ou seulement sur le flush 3.

Sur le LG5 de la carte mâle, des QTLs significatifs et putatifs liés à la concentration en pigments photosynthétiques par unité de surface colocalisent avec un QTL putatif lié à la quantité en protéines totales par unité de surface foliaire, là aussi en montrant un lien physique dans la régulation de ces deux éléments dans la feuille.

Sur le LG6 de la carte femelle, un QTL significatif lié à la teneur en protéines solubles par gramme de masse sèche colocalise avec un QTL putatif pour la quantité de Rubisco également par unité de masse dans le flush 2 et à 680 vpm $[CO_2]$, et ils colocalisent avec un QTL lié au pourcentage d'activation de la Rubisco mais pour les environnements opposés. Il serait alors intéressant de savoir si un gène codant pour la Rubisco était localisé sur ce groupe de liaison.

Sur le LG6 de la carte mâle, ce sont trois QTLs significatifs pour le fort $[CO_2]$ associés à l'assimilation carbonée à t3 à la quantité de Rubisco exprimée par unité de surface et par gramme d'azote qui colocalisent (là aussi, y-at-'il un gène codant pour la Rubisco ou un élément de sa régulation sur le chromosome ?), avec deux QTLs putatifs supplémentaires pour l'efficience d'utilisation de l'eau et la conductance stomatique mais à 380 vpm $[CO_2]$ et pour le flush 2. Saintagne *et al.* (2004) Scotti-Saintagne *et al.* (2004) trouvent en complément dans la même région respectivement un QTL associé à la longueur de la feuille de chêne et un QTL

associé à la croissance en hauteur, ce qui nous ramène à des caractères liés à la photosynthèse (soit par la taille de la surface photosynthétique, soit par la résultante de la photosynthèse, à savoir la croissance). Ces colocalisations restent à confirmer, étant donné que nous n'avons pas trouvé de QTLs liés à la croissance dans cette région avec nos résultats.

Sur le LG7 de la carte femelle, on a une colocalisation entre deux QTLs significatifs associés à la teneur en caroténoïdes par masse sèche, l'activité de la HPR (donc la photorespiration) et des QTLs putatifs associés aux échanges gazeux (assimilation et conductance stomatique), ainsi qu'à l'efficience d'utilisation de l'eau calculée à partir de ces échanges gazeux.

Les groupes de liaison 8 des cartes mâle et femelle sont particulièrement riches en QTLs, et plusieurs zones de colocalisation peuvent être visualisées.

- Sur la carte femelle uniquement, il y a colocalisation entre des QTLs significatifs liés à la quantité de Rubisco par unité de masse, son activité totale, l'activité de la HPR, la teneur en caroténoïdes par unité de masse, et des QTLs putatifs pour la teneur en protéines totales, l'activité totale de la Rubisco exprimée par gramme de protéines et par gramme d'enzyme, les teneurs en chlorophylles et pigments par unité de surface, et l'activité de la GO. Bien sûr, tous ces QTLs n'ont pas été détectés pour les mêmes dates et conditions environnementales.
- Sur la carte mâle uniquement, il y a une colocalisation entre la quantité de Rubisco et un peu plus loin la discrimination foliaire et l'efficience d'utilisation de l'eau qui en a été déduite. Une autre zone voit une colocalisation entre les teneurs en pigments et la teneur en azote par unité de surface.
- Sur les deux cartes, sur le marqueur commun ssrQrZAG5a, on retrouve des QTLs putatifs liés à la teneur en azote foliaire par unité de surface, la conductance stomatique, le SLA, l'activité de la Rubisco exprimée par gramme de protéine ou par gramme d'enzyme, et l'activité de la PEPc. Ces QTLs colocalisent aussi avec des QTLs putatifs pour la quantité de protéines et de Rubisco par unité de masse foliaire.

Sur les groupes de liaison 9 des cartes mâle et femelle, on trouve une colocalisation entre des QTLs significatifs pour la teneur en protéines totales par masse sèche et par surface, les teneurs en pigments, et des QTLs significatifs liés à la discrimination mesurée sur la cellulose, l'assimilation carbonée et l'efficience d'utilisation de l'eau , la teneur en azote des feuilles et celle en saccharose par unité de masse.

Sur les groupes de liaison 11 des cartes génétiques parentales, pratiquement l'ensemble des caractères étudiés se retrouvent proches d'un même marqueur commun aux deux parents (ssrGrZAG111), qu'ils soient exprimés par unité de surface ou de masse foliaire. Le groupe de liaison 11 apparaît donc comme un groupe majeur dans la régulation du métabolisme primaire et de la croissance des chênes de la famille. Par contre, Saintagne *et al.* (2004) et Scotti-Saintagne *et al.* (2004) n'ont pas trouvé dans leurs expériences que ces groupes de liaison étaient des points chauds particulier pour la détection de QTLs.

Enfin, sur les groupes de liaison 12, on retrouve une colocalisation de QTLs putatifs et significatif liés à la croissance en hauteur et en biomasse avec des QTLs putatifs d'échanges gazeux (assimilation et conductance stomatique) sur la carte femelle, et des colocalisations entre plusieurs QTLs significatifs ou non associés à différents paramètres de la croissance et des QTLs putatifs liés à l'assimilation carbonée sur la carte mâle.

On voit donc que les colocalisations fournissent des indications complémentaires très intéressantes par rapport aux simples corrélations entre caractères phénotypiques, puisqu'elles permettent de localiser sur les cartes génétiques les sites impliqués dans la régulation d'un grand nombre de paramètres ensemble (du moins, si la détection de QTLs est assez fine, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience compte-tenu du nombre de répétitions permis par les contraintes expérimentales) et de prédire les loci qui co-régulent plusieurs de ces paramètres, que ce soit par un phénomène de régulation « pur » du QTL sur plusieurs caractères indépendents, soit parce que ces caractères ont des voies métaboliques (partiellement) communes dans lesquelles intervient ce QTL.

Dans notre expérience, nous ne pouvons que difficilement mettre en évidence des points de régulations communs à des voies métaboliques différentes, puisque le choix des paramètres phénotypiques étudiés s'est justement porté sur des points du métabolisme primaire très proches au niveau physiologique.

Par contre, même si les écart-types observés sont encore extrêmements importants pour des notions de régulation fines comme celles de la génétique, on peut nettement voir des regroupements importants de QTLs associés aux paramètres de la photosynthèse en particulier, que ce soit au niveau biochimique ou physiologique.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Cette étude a été particulièrement dense dans sa mise en place, sa réalisation et dans les analyses consécutives des résultats. Elle nous a permis de dégager de grandes lignes sur la variabilité intrafamiliale des réponses des chênes pédonculés au fort [CO_2].

Concernant la réponse de la physiologie des arbres au [CO_2]

- Nous avons montré que la physiologie des arbres avait été profondément modifiée par le [CO_2] élevé sur une seule saison de végétation passée en serre. Au niveau de l'individu entier, c'est une stimulation de la croissance en hauteur plus que en diamètre qui s'est produite, et une augmentation de la production de biomasse orientée préférentiellement vers les racines.
- Les échanges gazeux ont également mis en évidence une réponse significative au [CO_2], avec une stimulation précoce de la photosynthèse, mais qui ne se maintient pas dans le temps, et un abaissement plus tardif de la conductance stomatique mais soutenu jusqu'à la fin de la saison.
- L'efficience d'utilisation de l'eau calculée par différentes méthodes a été trouvée nettement supérieure sous [CO_2] élevé, mais uniquement grâce à la plus forte pénétration du CO_2 par les stomates malgré leur fermeture partielle qui sature le système photosynthétique.
- L'ensemble du système photosynthétique semble subir des remaniements de l'azote qui doit être réattribué à d'autres processus limitants ou acheminé vers les organes en croissance. Malgré la diminution de la quantité de pigments et de Rubisco et la baisse de l'activité de cette dernière, le système photosynthétique a optimisé leur répartition de telle manière à avoir une photosynthèse finale équivalente à celle des arbres sous [CO_2] ambiant, avec une meilleure efficience d'utilisation de l'azote et une production limitée de sucres.
- Les voies adjacentes à la photosynthèse (photorespiration, assimilation azotée) semblent ralenties par le [CO_2] élevé. On peut imaginer alors que l'ensemble du métabolisme azoté est perturbé par le fort [CO_2], avec un ralentissement de la production d'acides aminés à partir de l'azote minéral, et par contre une utilisation de l'azote organique contenu en surabondance dans le système photosynthétique, azote qui est probablement redistribué vers les processus limitants du développement des arbres.

Concernant la variabilité intraspécifique

- L'analyse statistique de l'ensemble des données physiologiques a permis de détecter un grand nombre de QTLs associés aux différents traits étudiés, les activités enzymatiques et les données de croissance étant un peu moins bien représentées, et restent à confirmer avec de nouvelles études. On voit donc que pour tous nos traits phénologiques, la famille présente une grande variabilité phénotypique et un déterminisme génétique évident, et certaines de ces informations sont nouvelles par rapport aux autres expériences menées en génétique quantitative jusqu'à présent.

- Plus spécifiquement, des QTLs associés à la discrimination isotopique contre le ^{13}C ont été détectés et localisés dans les mêmes zones génétiques que trouvées simultanément dans une autre expérience en cours de publication et effectuée à l'aide de nombreuses répétitions, révélant une très grande stabilité dans leur expression malgré les variations environnementales.

- Une dizaine de QTLs déterminés par analyse multi-environementale ont montré des réponses spécifiques à l'élévation du $[CO_2]$ atmosphérique, et donnent des renseignement complémentaires par rapport aux QTLs « simples » détectés qui déterminent la physiologie des individus dans un environnement donné.

- Plusieurs groupes de liaison comportent des ensembles cohérents de QTLs situés de façon proche les uns des autres, et généralement liés au système photosynthétique (Rubisco et pigments) ou à la biomasse et à la répartition de l'azote entre les différents pools azotés de la feuille, les groupes de liaison 2, 8, 9, 11 et 12 étant particulièrement riches en QTLs. Pour plusieurs d'entre eux, on peut se demander si le marqueur autour duquel se trouvent les différents QTLs ne serait pas situé à proximité d'un gène codant pour la Rubisco ou un élément régulateur de celle-ci. Pour le dernier groupe de liaison de la carte mâle, c'est un ensemble de QTLs liés à la croissance qui a été observé. Des QTLs liés à la phénologie et à la croissance ont été détectés sur la même famille par Saintagne *et al.* (2004) et Scotti-Saintagne *et al.* (2004) dans la même région génomique du groupe de liaison 6 de la carte mâle que certains des QTLs que nous avons détecté pour la Rubisco et les échanges gazeux, ce qui offre des perspectives d'étude futures sur cette zone concernant les différents paramètres pouvant réguler la photosynthèse.

Perspectives de travail

Cette expérience a permis de montrer qu'il était important d'intégrer plusieurs types d'approche de la réponse d'un individu aux variations de son environnement. Deux grandes idées se dégagent après avoir effectué le bilan des recherches :

- Etant donné que l'efficience d'utilisation de l'eau est un caractère complexe impliquant un grand nombre de fonctions physiologiques (photosynthèse, conductance stomatique…) et anatomiques (caractéristiques des vaisseaux conducteurs du bois, conductance hydraulique, anatomie foliaire…), il semble pertinent de déterminer précisément quelles sont parmi les composantes de ces fonctions celles qui contribuent à la variabilité de WUE chez les chênes.

- Des données plus fines au niveau de l'expression des gènes (données en biologie moléculaire sur l'expression des gènes de la Rubisco, par exemple) seraient également intéressantes à rechercher, toujours dans l'optique de déterminer des éléments de régulation majeurs communs aux différents paramètres étudiés.

Pour continuer sur ces deux thèmes, il sera important de résoudre un problème majeur qui s'est posé durant l'expérience qui est la contrainte expérimentale vis-à-vis de la recherche de QTLs. Pour poursuivre cette expérience, il sera donc nécessaire d'augmenter le nombre de génotypes étudiés ainsi que le nombre de répétitions pour chacun d'entre eux afin d'améliorer la détection des QTLs.

La sélection des arbres pour leurs capacités à stocker du carbone devrait théoriquement être possible grâce à la découverte de ces QTLs, mais il apparaît que la photosynthèse est un processus encore bien trop complexe pour envisager une sélection assistée par marqueurs comme cela est déjà fait pour certains critères économiques comme pour la qualité du bois ou sa résistance à diverses contraintes. Cependant, des voies sont ouvertes par la découverte de QTLs extrêmement stables tels que trouvés pour la discrimination isotopique contre le ^{13}C, et la recherche mérite de continuer dans cette direction.

« Que ceci soit la fin du livre,
mais non la fin de la recherche »

Bernard de Clairvaux (1090 – 1153)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AINSWORTH EA, and LONG SP. 2005. Tansley Review: What have we learned from 15 years of free-air CO_2 enrichment (FACE) ? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO_2. New Phytologist 165: 351-372.

ALAOUI-SOSSE B, PARMENTIER C, DIZENGREMEL P, and BARNOLA P. 1994. Rhythmic growth and carbon allocation in *Quercus robur*. 1. Starch and Sucrose. Plant Physiology and Biochemistry 32: 331-339.

ALAOUI-SOSSE B, RICAUD S, BARNOLA P, and DIZENGREMEL P. 1996. Rythmic growth and carbon allocation in *Quercus robur*. Sucrose metabolizing enzymes in leaves. Physiologia Plantarum 96: 667-673.

ALATOU D, BARNOLA P, LAVARENNE S, and GENDRAU M. 1989. Caractérisation de la croissance rythmique du chêne pédonculé. Plant Physiology and Biochemistry 27: 275-280.

AMTHOR JS. 1995. Higher plant respiration and its relationships to Photosynthesis. In: Schulze E-DC, M.M., ed. Ecophysiology of Photosynthesis. 71-101.

ARCADE A, FAIVRE-RAMPANT P, PAQUES LE, and PRAT D. 2002. Localisation of genomic regions controlling microdensitometric parameters of wood characteristics in hybrid larches. Annals of Forest Science 59: 607-615.

ARP WJ. 1991. Effects of source-sink relations on photosynthestic acclimation to elevated CO_2. Plant, Cell and Environment 14: 869-875.

ATKINSON CJ, TAYLOR JM, WILKINS D, and BESFORD RT. 1997. Effects of elevated CO_2 on chloroplast components, gas exchange and growth of oak and cherry. Tree Physiology 17: 319-325.

BADECK F-W, DUFRÊNE E, EPRON D, LE DANTEC V, LIOZON R, MOUSSEAU M, PONTALLIER J-Y, and SAUGIER B. 1997a. Sweet-chesnut and Beech saplings under elevated CO_2. In: al. GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic. 15-25.

BADECK F-W, LIOZON R, GENTLY B, MEYER S, and SAUGIER B. 1997b. On the significance of internal resistance in tree leaves for gaz exchange under elevated CO_2. In: al. GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic.

BAINBRIDGE G, MADGWICK P, PARMAR S, MITCHELL R, PAUL M, PITTS J, KEYS AJ, and PARRY MAJ. 1995. Engeneering Rubisco to change its catalytic properties. Journal of Experimental Botany 46: 1269-1276.

BALAGUER L, AFIF D, DIZENGREMEL P, and DREYER E. 1996. Specificity factor ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Quercus robur*. Plant Physiology and Biochemistry 34: 879-883.

BARNOLA JM, RAYNAUD D, LORIUS C, and BARKOV NI. 1999. Historical CO_2 record from the Vostok ice core.: A Compendium of Data on Global Change. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee., U.S.A.

BARRENECHE T, BODENES C, LEXER C, TRONTIN J-F, FLUCH S, STREIFF R, PLOMION C, ROUSSEL G, STEINKELLNER H, BURG K, FAVRE J-M, GLÖSSL J, and KREMER A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. Theorical Applied in Genetics 97: 1090-1103.

BEAVIS WD. 1994. The power and deceipt of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. Forty-ninth annual corn & sorghum industry research conference, 250-266.

BECKER M, and LEVY G. 1990. Le point sur l'écologie comparée du chêne sessile et du chêne pédonculé. Revue Forestière Française 42: 148-154.

BEERLING DG, and WOODWARD FI. 1995. Leaf stable carbon isotope composition records increased water-use efficiency of C3 plants in response to atmospheric CO_2 enrichment. Functional Ecology 9: 394-401.

BEERLING DJ. 1996. Ecophysiological responses of woody plants to past CO_2 concentrations. Tree Physiology 16: 389-396.

BEERLING DJ. 1997. Carbon isotope discrimination and stomatal responses of mature *Pinus sylvestris* L. trees exposed in situ for three years to elevated CO_2 and temperature. Acta Oecologica 18: 697-712.

BERNET GP, MARGAIX C, JACAS J, CARBONELL EA, and ASINS MJ. 2005. Genetic analysis of citrus leafminer susceptibility. Theorical Applied in Genetics 110: 1393-1400.

BERTONI GP, and BECKER WM. 1996. Expression of the Cucumber HydroxyPyruvate Reductase gene is down-regulated by elevated CO_2. Plant Physiology 112: 599-605.

BESFORD RT, and HAND DW. 1989. The effects of CO_2 enrichment and nitrogen oxides on some Calvin cycle enzymes and Nitrite reductase in glasshouse lettuce. Journal of Experimental Botany 40: 329-336.

BESFORD RT, MOUSSEAU M, and MATTEUCCI G. 1998. Biochemistry, physiology and biophysics of photosynthesis. 29-78.

BETTARINI I, VACCARI FP, and MIGLIETTA F. 1998. Elevated CO_2 concentrations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO_2 spring in central Italy. Global Change Biology 4(1): 17-22.

BLACKWELL RD, MURRAY AJS, and LEA PJ. 1990. Enzymes of the photorespiratory carbon pathway. In: Dey PM, Harborne,J.B. & Lea,P.J., ed. Methods in plant biochemistry: Academic Press. 129-144.

BLACKWELL RD, MURRAY AJS, and LEA PJ. 1990. Photorespiratory mutants of the mitochondrial conversion of glycine to serine. Plant Physiology 94: 1316-1322.

BOICHARD D, GROHS C, BOURGEOIS F, CERQUEIRA F, FAUGERAS R, NEAU A, MILAN D, and LEVEZIEL H. 2000. La recherche de QTL à l'aide de marqueurs: Résultats chez les bovins laitiers. Productions Animales Special Issue: 217-222.

BOOKER FL, REID CD, BRUNSCHÖN-HARTI S, FISCUS EL, and MILLER JE. 1997. Photosynthesis and photorespiration in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) chronically exposed to elevated carbone dioxide and ozone. Journal of Experimental Botany 48: 1843-1852.

BOWES G. 1991. Growth at elevated CO_2 : photosynthetic responses mediated through Rubisco. Plant, Cell and Environment 14: 795-806.

BOWES G. 1996. Photosynthetic responses to changing atmospheric carbon dioxide concentration. In: Baker NR, ed. Photosynthesis and the Environment: Kluwer Academic Publishers. 387-407.

BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

BRADSHAW HD, and GRATTAPAGLIA D. 1994. QTL mapping in interspecific hybrids of forest trees. Forest Genetics 1: 191-196.

BRADSHAW HD, and STETTLER RF. 1995. Molecular genetics of growth and development on Populus. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree. Genetics 139: 963-973.

BRENDEL O. 2001. Does bulk-needle $\delta^{13}C$ reflect short-term discrimination ? Annals of Forest Science 58: 135-141.

BRENDEL O, POT D, PLOMION C, ROZENBERG P, and GUEHL J-M. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}C$ and ring width in maritime pine. Plant, Cell and Environment 25: 945-953.

BRENDEL O, HANDLEY LL, and GRIFFITHS H. 2003. The $\delta^{13}C$ of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles: spatial and temporal variations. Annals of Forest Science 60: 97-104.

BROWN GR, BASSONI DL, GILL GP, FONTANA JR, WHEELER NC, MEGRAW RA, DAVIS MF, SEWELL MM, TUSKAN GA, and NEALE DB. 2003. Identification of Quantitative Trait Loci Influencing Wood Property Traits in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL Verification and Candidate Gene Mapping. Genetics 164: 1537-1546.

BROWN JS, SCHNELL RJ, MOTAMAYOR JC, LOPES U, KUHN DN, and BORRONE JW. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. Journal of the American Society for Horticultural Science 130: 366-373.

BRUGIERE N, SUZUKI A, and HIREL B. 1997. Assimilation de l'ammonium. In: J.-F. M-G, ed. Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire: INRA éditions. 85-107.

BUNCE JA. 1992. Stomatal conductance, photosynthesis and respiration of temperate deciduous tree seedlings grown outdoors at an elevated concentration of carbon dioxide. Plant, Cell and Environment 15: 541-549.

CAO M, and WOODWARD FI. 1998. Dynamic responses of terrestrial ecosystem carbon cycling to global climate change. Nature 393: 249-252.

CASANOVA-KATNY MA, HOFFMANN-THOMA G, SCHRIER AA, FANGMEIER A, JÄGER H-J, and VAN BEL AJE. 2005. Increase of photosynthesis and starch in potato under elevated CO_2 is dependent on leaf age. Journal of Plant Physiology 162: 429-438.

CASASOLI M, POT D, PLOMION C, MONTEVERDI MC, BARRENECHE T, LAUTERI M, and VILLANI F. 2004. Identification of QTLs affecting adaptative traits in *Castanea sativa* Mill. Plant, Cell and Environment 27: 1088-1101.

CAUSSE M, ROCHER JP, HENRY AM, CHARCOSSET A, PRIOUL JL, and DE VIENNE D. 1995. Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci. Molecular Breeding 1: 259-272.

CEULEMANS R, and MOUSSEAU M. 1994. Tansley Review N°71. Effects of elevated atmospheric CO2 on woody plants. New Phytologist 127: 425-446.

CEULEMANS R, Van PRAET L, and JIANG XN. 1995. Effects of CO2 enrichment, leaf position and clone on stomatal index and epidermal cell density in poplar (Populus). New Phytologist 131: 99-107.

CEULEMANS R, JANSSENS IA, and JACH ME. 1999. Effects of CO2 enrichment on trees and forests: lessons to be learned in view of future ecosystem studies. Annals of Botany 84: 577-590.

CHAMPAGNAT P, PAYAN E, CHAMPAGNAT M, BARNOLA P, LAVARENNE S, and BERTHOLON C. 1986. La croissance rythmique de jeunes chênes pédonculés cultivés en conditions contrôlées et uniformes. Naturalia Monspeliensia, Colloque International sur l'Arbre, 303-337.

CHENG S-H, MOORE BD, and SEEMAN JR. 1998. Effects of short- and long-term elevated CO2 on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Plant Physiology 116: 715-723.

CIAIS P. 1999. Restless carbon pools. Nature 398: 111-112.

CITERNE A, and DIZENGREMEL P. 1986. Effets du dépérissement sur la respiration des aiguilles d'épicéa. *Actes DEFORPA* 3, INRA : 125-140.

COLOMBO T, and SANTAGUIDA R. 1998. Atmospheric CO_2 record from in situ measurements at Mt.Cimone. A Compendium of Data on Global Change. Oak Ridge, Tenn., U.S.A.: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy.

CONNER PJ, BROWN SK, and WEEDEN NF. 1998. Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. Theorical Applied Genetics 96: 1027-1035.

CONROY J. 1992. Influence of elevated CO_2 concentrations on plant nutrition. Australian Journal of Botany 40: 445–456.

COSTA P, and PLOMION C. 1999. Genetic analysis of needle proteins in maritime pine. 2. Variation of protein accumlation. Silvae Genetica 48: 146-150.

COTRUFO MF, INESON P, and SCOTT Y. 1998. Elevated CO2 reduces the nitrogen concentration of plant tissues. Global Change Biology 4: 43.

COUSINS AS, ADAM NR, WALL GW, KIMBALL BA, PINTER PJJ, LEAVITT SW, LAMORTE RL, MATTHIAS AD, OTTMAN MJ, THOMPSON TL, and WEBBER AN. 2001. Reduced photorespiration and increased energy-use efficiency in young CO2 - enriched sorghum leaves. New Phytologist 150: 275-284.

CRAIG H. 1954. Carbon-13 variations in sequoia rings and the atmosphere. Science 119: 141-144.

CROUZILLAT D, MENARD B, MORA A, PHILLIPS W, and PETIARD V. 2000. Quantitative trait analysis in Theobroma cacao using molecular markers: Yield QTL detection and stability over 15 years. Euphytica 114: 12-23.

CURE JD, and ACOCK B. 1986. Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. Agricultural and Forest Meteorology 38: 127-145.

CURTIS PS, VOGEL CS, PREGITZER KS, ZAK DR, and TEERI JA. 1995. Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO_2 on leaf area growth and carbon gain physiology in Populus x euramericana (Dode) Guinier. New Phytologist 129: 253-263.

CURTIS PS, and WANG X. 1998. A meta-analysis of elevated CO2 effects on woody plant mass, form, and physiology. Oecologia 113: 299-313.

DALSTEIN L, TORTI X, LE THIEC D, and DIZENGREMEL P. 2002. Physiological study of declining *Pinus cembra* (L.) trees in southern France. Trees 16: 299-305.

DAMERVAL C, MAURICE A, JOSSE JM, and DE VIENNE D. 1994. Quantitative trait loci underlying gene product variation: A novel perspective for analyzing regulation of genome expression. Genetics 137: 289-301.

DARVASI A, and PISANTE-SHALOM A. 2002. Complexities in the genetic dissection of quantitative trait loci. Trends In Genetics 18: 489-491.

DE GROOT CC, VAN DEN BOOGAARD R, MARCELIS LFM, HARBINSON J, and LAMBERS H. 2003. Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in toamto plants in relation to feedback limitation. Journal of Experimental Botany 54: 1957-1967.

DE LA VINA G, PLIEGO-ALFARO F, DRISCOLL SP, MITCHELL VJ, PARRY MA, and LAWLOR DW. 1999. Effects of CO2 and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. Plant Physiology and Biochemistry 37: 587-595.

DE NIRO MJ, and EPSTEIN S. 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. Science 197: 261-263.

DE VIENNE D. 1990. L'analyse du déterminisme génétique des caractères quantitatifs chez les végétaux. Société Française de Génétique 10: XI-XVI.

DE VIENNE D, and CAUSSE M. 1997. La cartographie et la localisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: De Vienne D, ed. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris: INRA. 99-118.

DE VIENNE D, BOST B, FIEVET J, ZIVY M, and DILLMAN C. 2001. Genetic variability of proteome expression and metabolic control. Plant Physiology and Biochemistry 39: 271-283.

DELEENS E, BARTHES L, and PRIOUL J-L. 1993. Modélisation du fractionnement isotopique du flux de C photosynthétique chez les végétaux à métabolisme C3 et C4 et les applications obtenues en chambre d'assimilation. In Maillard PB, R., ed. Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes. Paris (France), 43-64.

DEVEY ME, CARSON SD, NOLAN MF, MATHESON AC, TE RIINI C, and HOHEPA J. 2004. QTL associations for density and diameter in Pinus radiata and the potential for marker-aided selection. Theorical Applied in Genetics 108: 516-524.

DIXON RK, BROWN S, HOUGHTON RA, SOLOMON AM, TREXLER MC, and WISNIEWSKI J. 1994. Carbon pools and flux of global forest ecosystems. Science 263: 185-190.

DOLISY D. 1999. Corrélation entre la circulation inter urbaine et la pollution atmosphérique par l'ozone et les particules grace à l'utilisation de bio indicateurs végétaux et impact de l'ozone sur l'assimilation du carbone. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1.

DOUCE R, and NEUBURGER M. 1999. Biochemical dissection of photorespiration. Current Opinion in Plant Biology 2: 214-222.

DUQUESNAY A, BREDA N, STIEVENARD M, and DUPOUEY JL. 1998. Changes of tree-ring $\delta^{13}C$ and water-use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) in north-eastern France during the past century. Plant, Cell and Environment 21: 565-572.

EAMUS D, and JARVIS PG. 1989. The direct effects of increase in the global atmopsheric CO_2 concentration on natural and commercial temperate trees and forests. Advances in Ecological Research 19: 1-15.

EAMUS D. 1991. The interaction of rising CO_2 and temperatures with water-use efficiency. Plant, Cell and Environment 14: 843-852.

EAMUS D, and CEULEMANS R. 2001. Effects of greenhouse gases on the gas exchange of forest trees.

EDWARDS A, HAMMOND HA, JIM L, CASKEY CT, and CHAKRABORTY R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 12 (2) : 241-253.

EHLERINGER JR, and CERLING TE. 1995. Atmospheric CO_2 and the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentrations in plants. Tree Physiology 15: 105-111.

EICHELMANN H, and LAISK A. 1999. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge, and mesophyll conductance in leaves. Plant Physiology 119: 179-189.

EICHELMANN H, OJA V, RASULOV B, PADU E, BICHELE I, PETTAI H, MÖLS T, KASPAROVA I, VAPAAVUORI E, and LAISK A. 2004. Photosynthetic parameters of birch (*Betula pendula* Roth.) leaves growing in normal and in CO_2 - and O_3 - enriched atmospheres. Plant, Cell and Environment 27: 479-495.

EPRON D, LIOZON R, and MOUSSEAU M. 1996. Effects of elevated CO_2 concentration on leaf characteristics and photosynthetic capacity of beech (*Fagus sylvatica*) during the growing season. Tree Physiology 16: 425-432.

ESQUIVEL MG, FERREIRA RB, and TEIXEIRA AR. 2000. Protein degradation in C3 and C4 plants subjected to nutrient starvation. Particular reference to ribulose bisphosphate carboxylase / oxygenase and glycolate oxydase. Plant Science 153: 15-23.

ETHERIDGE DM, STEELE LP, LANGENFELDS RL, DEFRANCEY RJ, BARNOLA J-M, and MORGAN VI. 1998. Historical CO_2 records from the Law Dome DE08, DE08-2, and DSS ice cores. A Compendium of Data on Global Change. Oak Ridge, Tenn., U.S.A.: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy.

EVANS JR. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia 78: 9-19.

EVANS JR, and Von CAEMMERER S. 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. Plant Physiology 110: 339-346.

FANGMEIER A, and JÄGER H-J. 1998. CO_2 enrichment, ozone, nitrogen fertilizer and wheat: background of growth and yield responses. In: De Kok LJ and Stulen I, eds. Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers. 299-304.

FARQUHAR GD, Von CAEMMERER S, and BERRY JA. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C3 species. Planta 149: 78-90.

FARQUHAR GD, O'LEARY MH, and BERRY JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. Australian Journal of Plant Physiology 9: 121-137.

FARQUHAR GD, and RICHARDS RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. Australian Journal of Plant Physiology 11: 539-552.

FARQUHAR GD, EHLERINGER J, and HUBICK KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 503-537.

FARRAR JF, and WILLIAMS ML. 1991. The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. Plant, Cell and Environment 14: 819-830.

FEIERABEND J, and BEEVERS H. 1972. Developmental studies on microbodies in wheat leaves. Conditions influencing enzyme development. Plant Physiology 49: 28-32

FERRARIO-MERY S, THIBAUD M-C, BETSCHE T, VALADIER M-H, and FOYER CH. 1997. Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana plumbaginifolia* during CO_2 enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. Planta 202: 510-521.

FERRIS R, LONG L, BUNN SM, ROBINSON KM, BRADSHAW HD, RAE AM, and TAYLOR G. 2002. Leaf stomatal and epidermal cell development: identification of putative quantitative trait loci in relation to elevated carbon dioxide concentration in poplar. Tree Physiology 22: 633-640.

FLAMENT M-H, KEBE I, CLEMENT D, PIERETTI I, RISTERUCCI A-M, N'GORAN J-A-K, CILAS C, and LANAUD C. 2001. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. Genome 44: 79-85.

FLANAGAN LB, and JONHSEN KH. 1995. Genetic variation in carbon isotope discrimination and its relationship to growth under field conditions in full-sib families of *Picea mariana*. Canadian Journal of Forest Research 25: 39-47.

FRACHEBOUD Y, RIBAUT J-M, VARGAS M, MESSMER R, and STAMP P. 2002. Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mais* L.). Journal of Experimental Botany 53: 1967-1977.

FREWEN BE, CHEN T, HOWE GT, DAVIS J, ROHDE A, BOERJAN W, and BRADSHAW HD. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in Populus. Genetics 154: 837-845.

GALLAIS A, and HIREL B. 2004. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. Journal of Experimental Botany 55: 295-306.

GARCIA MR, ASINS MJ, and CARBONELL EA. 2000. QTL analysis of yield and seed number in Citrus. Theorical Applied in Genetics 101: 487-493.

GARDNER SDL, TAYLOR G, and BOSAC C. 1995. Leaf growth of hybrid poplar following exposure to elevated CO_2. New Phytologist 131: 81-90.

GEBAUER RLE, STRAIN BR, and REYNOLDS JF. 1998. The effect of elevated CO_2 and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). Oecologia 113: 29-36.

GEORGE V, GERANT D, and DIZENGREMEL P. 1996. Photosynthesis, Rubisco activity and mitochondrial malate oxidation in pedunculate oak (*Quercus robur* L.) seedlings grown under present and elevated atmospheric CO_2 concentrations. Annals of Forest Science 53: 469-474.

GESCH RW, KANG I-H, GALLO-MEAGHER M, VU JCV, BOOTE KJ, ALLEN LHJ, and BOWES G. 2003. Rubisco expression in rice leaves is related to genotypic variation of photosynthesis under elevated growth CO_2 and temperature. Plant, Cell and Environment 26: 1941-1950.

GIELEN B, and CEULEMANS R. 2001. The likely impact of rising atmospheric CO_2 on natural and managed Populus: a literature review. Environmental Pollution 115: 335-358.

GIFFORD RM, BARRETT DJ, and LUTZE JL. 2000. The effects of elevated CO_2 on the C:N and C:P mass ratios of plant tissues. Plant and Soil 224: 1-14.

GLEADOW RM, FOLEY WJ, and WOODROW IE. 1998. Enhanced CO_2 alters the relationship between photosynthesis and defence in cyanogenic E*ucalyptus cladocalyx* F. Muell. Plant, Cell and Environment 21: 12-22.

GOLDMAN IL, ROCHEFORD TR, and DUDLEY JW. 1993. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. Theorical and Applied Genetics 87 (1-2): 217-224.

GONZALEZ-MELER MA, TANEVA L, and TRUEMAN RJ. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO_2 concentration: cellular responses and global significance. Annals of Botany 94: 647-656.

GORISSEN A, KUIKMAN PJ, and VAN DE BEEK H. 1995. Carbon allocation and water use in juvenile Douglas fir under elevated CO_2. New Phytologist 129: 275-282.

GOULDEN ML, MUNGER JW, FAN S-M, DAUBE BC, and WOFSY ST. 1996. Exchange of carbon dioxide by a deciduous forest : response to interannual climate variability. Science 271: 1576-1578.

GREENEP H, TURNBULL MH, and WHITEHEAD D. 2003. Response of photosynthesis in second-generation *Pinus radiata* trees to long-term exposure to elevated carbon dioxide partial pressure. Tree Physiology 23: 569-576.

GRIFFIN KL, THOMAS FM, and STRAIN BR. 1993. Effects of nitrogen supply and elevated carbon dioxide on construction cost in leaves of *Pinus taeda* (L.) seedlings. Oecologia 95: 575-580.

GRIFFIN KL, ANDERSON RO, TISSUE DT, TURNBULL MH, and WHITEHEAD D. 2004. Variations in dark respiration and mitochondrial numbers within needles of *Pinus radiata* grown in ambient or elevated CO_2 partial pressure. Tree Physiology 24: 347-353.

GROOVER A, DEVEY M, FIDDLER T, LEE J, MEGRAW R, MITCHEL-OLDS T, SHERMAN B, VUJCIC S, WILLIAMS C, and NEALE D. 1994. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of Loblolly pine. Genetics 138: 1293-1300.

GUEHL J-M, PICON C, AUSSENAC G, and GROSS P. 1994. Interactive effects of elevated CO_2 and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two european forest tree species. Tree Physiology 14: 707-724.

GUEHL J-M, FORT C, and FERHI A. 1995. Differential response of leaf conductance, carbon isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak plants. New Phytologist 131: 149-157.

GUNDERSON CA, NORBY RJ, and WULLSCHLEGER SD. 1993. Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during three years of growth in elevated CO_2: no loss of photosynthetic enhancement. Plant, Cell & Environment 16: 797-807.

GUNDERSON CA, and WULLSCHLEGER SD. 1994. Photosynthetic acclimation in trees to rising atmospheric CO_2: a broader perspective. Photosynthesis Research 39: 369-388.

GUTTERIDGE S, and GATENBY AA. 1995. Rubisco synthesis, assembly mechanism, and regulation. Plant Cell 7: 809-819.

HALL AE, RICHARDS RA, CONDON AG, WRIGHT GC, and FARQUHAR GD. 1994. Carbon isotope discrimination and plant breeding. Plant Breeding Review 4: 81-113.

HAMILTON JG, THOMAS RB, and DELUCIA EH. 2001. Direct and indirect effects of elevated CO_2 on leaf respiration in a forest ecosystem. Plant, Cell and Environment 24: 975-982.

HANSON PJ, DICKSON RE, ISEBRANDS JG, CROW TR, and DIXON RK. 1986. A morphological index of Quercus seedlings ontogeny for use in studies of physiology an growth. Tree Physiology 2: 273-281.

HANSON PJ, ISEBRANDS JG, DICKSON RE, and DIXON RK. 1988. Ontogenic patterns of CO_2 exchange of *Quercus rubra* L. leaves during three flushes of shoot growth. I. Median flush leaves. Forest Science 34: 55-68.

HAUPT-HERTING S, KLUG K, and FOCK HP. 2001. A new approach to measure gross CO_2 fluxes in leaves. Gross CO_2 assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in Tomato under drought stress. Plant Physiology 126: 388-396.

HEMMING DL, SWITSUR VR, WATERHOUSE JS, HEATON THE, and CARTER AHC. 1998. Climate variation and the stable carbon isotope composition of tree ring cellulose: an intercomparison of *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* and *Pinus silvestris*. Tellus 50: 25-33.

HERRICK JD, MAHERALI H, and THOMAS RB. 2004. Reduced stomatal conductance in sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) sustained over long-term CO_2 enrichment. New Phytologist 162: 387-396.

HERVE D, FABRE F, BERRIOS EF, LEROUX N, AL CHAARANI G, PLANCHON C, SARRAFI A, and GENTZBITTEL L. 2001. QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. Journal of Experimental Botany 52: 1857-1864.

HIREL B, MARSOLIER MC, HOARAU A, HOARAU J, BRANGEON J, SCHAFER R, and VERMA DP. 1992. Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. Plant Molecular Biology 20: 207-218.

HUND A, FRACHEBOUD Y, SOLDATI A, FRASCAROLI E, SALVI S, and STAMP P. 2004. QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. Theorical Applied in Genetics 109: 618-629.

HURME P, SILLANPAA MJ, ARJAS E, REPO T, and SAVOLAINEN O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. Genetics 156: 1309-1322.

IDSO SB. 1999. The long-term response of trees to atmospheric CO_2 enrichment. Global Change Biology 5: 493-495.

IGAMBERDIEV AU, MIKKELSEN TN, AMBUS P, BAUWE H, LEA PJ, and GARDESTRÖM P. 2004. Photorespiration contributes to stomatal regulation and carbon isotope fractionation: a study with barley, potato and Arabidopsis plants deficient in glycine decarboxylase. Photosynthesis Research 81(2) : 139-152.

IM C-S, ZHANG Z, SHRAGER J, CHANG C-W, and GROSSMAN AR. 2003. Analysis of light and CO_2 regulation in Chlamydomonas reinhardtii using genome-wide approaches. Photosynthetis Research 75: 111-125.

INDERMÜHLE A, STOCKER TF, JOOS F, FISCHER H, SMITH HJ, WAHLEN M, WAHLEN M, DECK B, MASTRIANNI D, TSCHUMI J, BLUNIER T, MEYER R, and STAUFFER B. 1999. Holocene carbon-cycle dynamics based on CO_2 trapped in ice at Taylor Dome, Antarctica. Nature 389: 121-126.

INDERMÜHLE A, MONNIN E, STAUFFER B, and STOCKER TF. 2000. Atmospheric CO_2 concentration from 60 to 20 kyr BP from the Taylor Dome ice core, Antarctica. Geophysical Research Letters 27: 735-738.

IPCC. 2001. « Climate Change 2001: The Scientific Basis ». Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the International Panel on Climate Change. Cambridge, UK: Cambridge University Press. http://www.ipcc.ch/

ISHII H, OOISHI M, MARUYAMA Y, and KOIKE T. 2003. Acclimation of shoot and needle morphology and photosynthesis of two Picea species to differences in soil nutrient availability. Tree Physiology 23: 453-461.

JACH ME, and CEULEMANS R. 1997. Impact of elevated CO_2 on physiology and needle morphology of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. In: al. GMJMe, ed. *Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems*: Kluwer Academic. 67-73.

JACH ME, and CEULEMANS R. 1999. Effects of elevated atmospheric CO_2 on phenology, growth and crown structure of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings after two years of exposure in the field. Tree Physiology 19: 289-300.

JANSEN RC, and STAM P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136: 1447-1455.

JANSEN RC, VAN OOIJEN JW, STAM P, LISTER C, and DEAN C. 1995. Genotype by environment interaction in genetic mapping for multiple quantitative trait loci. Theorical Applied Genetics 91: 33-37.

JERMSTAD KD, BASSONI DL, JECH KS, RITCHIE GA, WHEELER NC, and NEALE DB. 2003. Mapping of Quantitative Trait Loci Controlling Adaptive Traits in Coastal Douglas Fir. III. Quantitative Trait Loci-by-Environment Interactions. Genetics 165: 1489-1506.

JOHNSON JD, TOGNETTI R, and PARIS P. 2002. Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO_2. Physiologia Plantarum 115: 93-100.

JUPIN H, and LAMANT A. 1997. La ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase : la Rubisco. La photosynthèse. 169-184.

JUUROLA E. 1997. Changes in respiration and photorespiration of Silver birch seedlings grown at high CO_2 concentration. In: al GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic. 41-45.

JUUROLA E. 2003. Biochemical acclimation patterns of *Betula pendula* and *Pinus sylvestris* seedlings to elevated carbon dioxide concentrations. Tree Physiology 23: 85-95.

KALINA J, EAJANEK M, SPUNDA V, and MAREK MV. 1997. Changes of the primary photosynthetic reactions of Norway spruce under elevated CO_2. In: al. GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic Publishers. 59-66.

KARNOSKY DF. 2003. Impacts of elevated atmospheric CO_2 on forest trees and forest ecosystems: knowledge gaps. Environmental International 29: 161-169.

KEELING CD, and WHORF TP. 2000. Atmospheric CO_2 records from sites in the SIO air sampling network. A Compendium of Data on Global Change. Oak Ridge, Tenn., U.S.A.: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy.

KELLOMÄKI S, and WANG K-Y. 1997. Effects of elevated O_3 and CO_2 concentrations on photosynthesis and stomatal conductance in Scots pine. Plant, Cell and Environment 20: 995-1006.

KIRSCHBAUM MUF, KING DA, CORNINS HN, McMURTIE RE, MEDLYN BE, PONGRACIC S, MURTY D, KEITH RJ, KHANNA PK, and SHERIFF DW. 1994. Modelling forest response to increasing CO_2 concentration under nutrient-limited conditions. Plant, Cell and Environment 17: 1081-1099.

KOYAMA ML, LEVESLEY A, KOEBNER RMD, FLOWERS TJ, and YEO AR. 2001. Quantitative Trait Loci for Component Physiological Traits Determining Salt Tolerance in Rice. Plant Physiology 125: 406-422.

KREMER A, and PETIT RJ. 1993. Gene diversity in natural populations of oak species. Annals of Forest Science 50: 186-202.

KRUSE J, HETZGER I, MAI C, POLLE A, and RENNENBERG H. 2003. Elevated pCO_2 affects N-metabolism of young poplar plants(*Populus tremula x P.alba*) differently at deficient and sufficient N-supply. New Phytologist 157: 65-81.

KUBISKE ME, and PREGITZER KS. 1996. Effects of elevated CO_2 and light availability on the photosynthetic light response of trees of contrasting shade tolerance. Tree Physiology 22: 351-358.

KUBISKE ME, PREGITZER KS, MIKAN CJ, ZAK DR, MAZIASZ JL, and TEERI JA. 1997. Populus tremuloides photosynthesis and crown architecture in response to elevated CO_2 and soil N availability. Oecologia 110: 328-336.

KUBISKE ME, PREGITZER KS, ZAK DR, and MIKAN CJ. 1998. Growth and C allocation of *Populus tremuloides* genotypes in response to atmospheric CO_2 and soil N availability. New Phytologist 140: 251-260.

KUMAR S, and GARRICK DJ. 2001. Genetic response to within-family selection using molecular markers in some radiata pine breeding schemes. Canadian Journal of Forest Research 31: 779-785.

LANDER ES, and BOTSTEIN D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.

LARIOS B, AGÜERA E, CABELLO P, MALDONADO JM, and DE LA HABA P. 2004. The rate of CO2 assimilation controls the expression and activity of glutamine synthetase through sugar formation in sunflower (Helianthus annuus L.) leaves. Journal of Experimental Botany 55(394): 69-75.

LATZKO E, and KELLY GJ. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. Physiologie Végétale 21: 805-815.

LE ROY P, and ELSEN J-M. 2000. Principes de l'utilisation des marqueurs génétiques pour la détection des gènes influençant les caractères quantitatifs. Productions Animales Special issue: 211-215.

LE THIEC D, and DIXON M. 1996. Acclimation of photosynthesis in Norway spruce and red oak grown in open-top chambers and subjected to natural drought and to elevated CO_2. Canadian Journal of Forest Research 26: 87-94.

LEA PJ, and MIFLIN BJ. 1974. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616

LEBRETON C, LAZIC-JANCIC V, STEED A, PEKIC S, and QUARRIE SA. 1995. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. Journal of Experimental Botany 46: 853-865.

LEE TD, TJOELKER MG, ELLSWORTH DS, and REICH PB. 2001. Leaf gas exchange responses of 13 prairie grassland species to elevated CO_2 and increased nitrogen supply. New Phytologist 150: 405-418.

LERCETEAU E, SZMIDT AE, and ANDERSSON B. 2001. Detection of quantitative trait loci in *Pinus sylvestris* L. across years. Euphytica 121: 117-122.

LESCUYER G, and LOCATELLI B. 1999. Rôle et valeur des forêts tropicales dans le changement climatique. Bois et Forêts des Tropiques 260: 5-18.

LESPINASSE D, GRIVET L, TROISPOUX V, RODIER-GOUD M, PINARD F, and SEGUIN M. 2000. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. Theorical Applied in Genetics 100: 975-984.

LEWIS CE, PERATONER G, CAIRNS AJ, CAUSTON DR, and FOYER CH. 1999. Acclimation of the summer annual species, *Lolium temulentum*, to CO_2 enrichment. Planta 210: 104-114.

LEWIS JD, WANG XZ, GRIFFIN KL, and TISSUE DT. 2002. Effects of age and ontogeny on photosynthetic responses of a determinate annual plant to elevated CO_2 concentrations. Plant, Cell & Environment 25.

LI C, and YEH FC. 2002a. QTLs for western gall rust (*Endocronartium harknessii*) resistance in lodgepole pine (*P. contorta* spp. latifolia). Forest Genetics 9: 137-144.

LI CR, LIANG YH, and HEW CS. 2002b. Responses of Rubisco and sucrose-metabolizing enzymes to different CO_2 in a C3 tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. Plant Science 163: 313-320.

LICHTENTHALER HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350–382.

LI MH, HOCH G, and KÖRNER C. 2002c. Source / sink removal affects mobile carbohydrates in *Pinus cembra* at the Swiss treeline. Trees 16: 331-337.

LIN J, JACH ME, and CEULEMANS R. 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO_2. New Phytologist 150: 665-674.

LINDROTH RL, KOPPER BJ, PARSONS WFJ, BOCKHEIM JG, KARNOSKY DF, HENDREY GR, PREGITZER KS, ISEBRANDS JG, and SOBER J. 2001. Consequences of elevated carbon dioxide and ozone for foliar chemical composition and dynamics in trembling aspen (*Populus tremuloides*) and paper birch (*Betula papyrifera*). Environmental Pollution 115: 395-404.

LING P, DUNCAN LW, DENG Z, DUNN D, HU X, HUANG S, and GMITTER JR. FG. 2000. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. Theorical Applied in Genetics 100: 1010-1017.

LIOZON R, BADECK F-W, GENTY B, MEYER S, and SAUGLER B. 2000. Leaf photosynthetic characteristics of beech (*Fagus sylvatica*) saplings during three years of exposure to elevated CO_2 concentration. Tree Physiology 20: 239-248.

LIU S, and TESKEY RO. 1995. Responses of foliar gas exchange to long-term elevated CO_2 concentrations in mature loblolly pine trees. Tree Physiology 15: 351-359.

LOADER NJ, ROBERTSON I, and Mc CARROLL D. 2003. Comparison of stable carbon isotope ratios in the whole wood, cellulose and lignin of oak tree-rings. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 196: 395-407.

LODGE RJ, DIJKSTRA P, DRAKE BG, and MORISON JIL. 2001. Stomatal acclimation to increased CO_2 concentration in a Florida scrub oak species *Quercus myrtifolia* Willd. Plant, Cell and Environment 24: 77-88.

LOISEAU P, and SOUSSANA JF. 1999. Elevated [CO_2], temperature increase and N supply effects on the turnover of below-ground carbon in a temperate grassland ecosystem. Plant and Soil 210: 233-247.

LONG SP. 1991. Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature. Plant, Cell and Environment 14: 729-739.

LOPEZ B, SABATE S, RUIZ I, and GRACIA C. 1997. Effects of elevated CO_2 and decreased water availability on Holm-Oak seedlings in controled environment chambers. In: Mohren GMJea, ed. Impacts of Gobal Change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic. 125-133.

LUDEWIG F, SONNEWALD U, KAUDER F, HEINEKE D, GEIGER M, STITT M, MÜLLER-RÖBER BT, GILLISSEN B, KÜHN C, and FROMMER WB. 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO_2. FEBS Letters 429: 147-151.

LUOMALA E-L, LAITINEN K, KELLOMÄKI S, and VAPAAVUORI E. 2003. Variable photosynthetic acclimation in consecutive cohorts of Scots pine needles during 3 years of growth at elevated CO_2 and elevated temperature. Plant, Cell and Environment 26: 645-660.

LUTZE JL, and GIFFORD RM. 1998. Carbon accumulation, distribution and water use of *Danthonia richardsonii* swards in response to CO_2 and nitrogen supply over four years of growth. Global Change Biology 4: 851-861.

MAILLARD P, GUEHL J-M, MULLER J-F, and GROSS P. 2001. Interactive effects of elevated CO_2 concentration and nitrogen supply on partitioning of newly fixed 13C and 15N between shoot and roots of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur*). Tree Physiology 21: 163-172.

MAKINO A, HARADA M, SATO T, NAKANO H, and MAE T. 1997a. Growth and N Allocation in Rice Plants under CO_2 Enrichment1. Plant Physiology 115: 199-203.

MAKINO A, SHIMADA T, TAKUMI S, KANEDO K, MATSUOKA M, SHIMAMOTO K, NAKANO H, MIYAO-TOKUTOMI M, MAE T, and YAMAMOTO N. 1997b. Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisens rbcS lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO_2 and light in rice plants? Plant Physiology 114: 483-491.

MAKINO A, HARADA M, KANEKO K, MAE T, SHIMADA T, and YAMAMOTO N. 2000. Whole-plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase under different CO_2 partial pressures. Australian Journal of Plant Physiology 27: 1-12.

MARINO BD, and Mc ELROY MB. 1991. Isotopic composition of atmospheric CO_2 inferred from carbon in C4 plant cellulose. Nature 349: 127-131.

MAROCO JP, BREIA E, FARIA T, PEREIRA JS, and CHAVES MM. 2002. Effects of long-term exposure to elevated CO_2 and N fertilization on the development of photosynthetic capacity and biomass accumulation in *Quercus suber* L. Plant, Cell & Environment 25: 105-113.

MARSHALL JD, and MONSERUD RA. 1996. Homeostatic gas-exchange parameters inferred from $^{13}C/^{12}C$ in tree rings of conifers. Oecologia 105: 13-21.

MARTIN B, NIENHUIS J, KING G, and SCHAEFFER A. 1989. Restriction Fragment Lenght Polymorphisms associated with Water Use Efficiency in Tomato. Science 243: 1725-1728.

MARTIN C, and SMITH AM. 1995. Starch biosynthesis. Plant Cell 7: 971-985.

MARTIN D. 1995. Etude des interactions entre la pollution due à l'ozone at le stress hydrique sur le métabolisme carboné chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). UHP-Nancy 1 - FIF. 41.

MARTINELLI LA, ALMEIDA S, BROWN IF, MOREIRA MZ, VICTORIA RL, STERNBERG LSL, FERREIRA CAC, and THOMAS WW. 1998. Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in a tropical forest in Rondonia, Brazil. Oecologia 114: 170-179.

MASLE J, GILMORE SR, and FARQUHAR GD. 2005. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. Nature 436 (11): 866-870.

Mc CARROLL D, and LOADER NJ. 2004. Stable isotopes in tree rings. Quaternary Science Reviews 23: 771-801.

Mc COUCH SR, and DOERGE RW. 1995. QTL mapping in rice. Trends In Genetics 11: 482-487.

Mc GUIRE, MELILLO JM, and JOYCE LA. 1995. The role of nitrogen in the response of forest net primary production to elevated atmospheric carbon dioxide. Annual Review of Ecological Systems 26: 473-503.

McMULLEN MD, BYRNE PF, SNOOK ME, WISEMAN BR, LEE EA, WIDSTROM NW, and COE EH. 1998. Quantitative trait loci and metabolic pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences 95 (5) : 1996-2000.

MEDLYN BE, and JARVIS PG. 1999. Design and use of a database of model parameters from elevated [CO2] experiments. Ecological Modelling 124: 69-83.

MEDLYN BE, BADECK F-W, PURY DGG, BARTON CVM, BROADMEADOW MSJ, CEULEMANS R, ANGELIS P, FORSTREUTER M, JACH ME, KELLOMÄKI S, LAITAT E, MAREK MV, PHILIPPOT S, REY A, STRASSEMEYER J, LAITINEN K, LIOZON R, PORTIER B, ROBERNTZ P, WANG K, and JARVIS PG. 1999. Effects of elevated CO_2 on photosynthesis in European forest species: a meta-analysis of model parameters. Plant, Cell and Environment 22: 1475-1495.

MEDLYN BE, BARTON CVM, BROADMEADOW MSJ, CEULEMANS R, DE ANGELIS P, FORSTREUTER M, FREEMAN M, JACKSON SB, KELLOMÄKI S, LAITAT E, REY A, ROBERNTZ P, SIGURDSSON BD, STRASSEMEYER J, WANG K, CURTIS PS, and JARVIS PG. 2001. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO_2 concentration: a synthesis.

MELILLO JM, McGUIRE AD, KICKLIGHTER DW, MOORE BI, VOROSMARTY J, and SCHLOSS AL. 1993. Global climate change and terrestrial net primary production. Nature 363: 234-240.

MENZEL A, and FABIAN P. 1999. Growing season extended in Europe. Nature 397: 659.

MIFLIN BJ, and HABASH DZ. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. Journal of Experimental Botany 53: 979-987.

MIFLIN BJ, and LEA PJ. 1980. Ammonia assimilation. In (BJ Miflin ed) "The Biochemistry of Plants" Vol 5, Academic Press, New York, pp 169 - 202.

MIGGE A, and BECKER T. 2000. Greenhouse-grown conditionally lethal tobacco plants obtained by expression of plastidic glutamine synthetase antisense RNA may contribute to biological safety. Plant Science 153: 107-112.

MIGLIETTA F, BETTARINI I, RASCHI A, KÖRNER C, and VACCARI FP. 1998. Isotope discrimination and photosynthesis of vegetation growing in the Bossoleto CO_2 spring. Chemosphere 36: 771-776.

MILAN D. 2000. Notion de gène candidat. Productions Animales Special Issue: 119-123.

MITCHELL-OLDS T. 1995. The molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. Tree 10: 324-328.

MOORE BD, CHENG S-H, RICE J, and SEEMAN JR. 1998. Sucrose cycling, Rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO_2. Plant, Cell and Environment 21: 905-915.

MOORE BD, CHENG S-H, SIMS D, and SEEMAN JR. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO_2. Plant, Cell & Environment 22: 567-582.

MOROT-GAUDRY J-F. 1997. Le double-jeu de RubisCO. Biofutur 166: 28-30.

MOUSSEAU M, and SAUGIER B. 1992. The direct effect of increased CO_2 on gas exchange and growth of forest tree species. Journal of Experimental Botany 43: 1121-1130.

MOUSSEAU M, DUFRÊNE E, El KOHEN A, EPRON D, GODARD D, LIOZON R, PONTALLIER J-Y, and SAUGIER B. 1996. Growth strategy and tree response to elevated CO2: a comparison of beech (*Fagus sylvatica*) ans sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). In: Koch GWM, H.A., ed. Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems: Academic Press. 71-86.

MÜLLER M, ZELLNIG G, TAUSZ M, WONISCH A, DE KOK L, SOJA G, and GRILL D. 1997. Structural changes and physiological stress responses of Spruce trees to SO_2, O_3 and elevated levels of CO_2. In: al. GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic. 93-102.

MYNENI RB, KEELING CD, TUCKER CJ, ASRAR G, and NEMANI RR. 1997. Increased plant growth inthe Northern high latitudes from 1981 to 1991. Nature 386: 698-702.

NADELHOFFER KJ, EMMETT BA, GUNDERSEN P, KJØNAAS, KOOPMANS CJ, SCHLEPPI P, TIETEMA A, and WRIGHT RF. 1999. Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. Nature 398: 145-148.

NEALE DB, SEWELL MM, and BROWN GR. 2002. Molecular dissection of the quantitative inheritance of wood property traits in loblolly pine. Annals of Forest Science 59: 595-605.

NGUYEN TU TT, KÜRSCHNER WM, SCHOUTEN S, and VAN BERGEN PF. 2004. Leaf carbon isotope composition of fossil and extant oaks grown under differing atmospheric CO_2 levels. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 212: 199-213.

NIE G-Y, HENDRIX DL, WEBBER AN, KIMBALL BA, and LONG SP. 1995. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO_2 concentration in the field. Plant Physiology 108: 975-983.

NORBY RJ and LUO Y. 2004. Evaluating ecosystem responses to rising atmospheric CO_2 and global warming in a multi-factor world. New Phytologist 162: 281-293.

NORBY RJ, PASTOR J, and MELILLO M. 1986. Carbon-Nitrogen interactions in CO_2 -enriched white oak: physiological and long-term perspectives. Tree Physiology 2: 233-241.

NORBY RJ, and O'NEILL EG. 1989. Growth dynamics and water use of seedlings of *Quercus alba* L. in CO_2 -enriched atmospheres. New Phytologist 111: 491-500.

NORBY RJ, and O'NEILL EG. 1991. Leaf area compensation and nutrient interactions in CO_2 -enriched seedlings of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). New Phytologist 117: 515-528.

NORBY RJ, SHOLTIS JD, GUNDERSON CA, and JAWDY SS. 2003. Leaf dynamics of a deciduous forest canopy: No response to elevated CO_2. Oecologia 136 (4): 574-584.

NORBY RJ, WULLSCHLEGER SD, GUNDERSON CA, and NIETCH CT. 1995. Increased growth efficiency of *Quercus alba* trees in a CO_2 -enriched atmosphere. New Phytologist 131: 91-97.

NORBY RJ, WULLSCHLEGER ST, and GUNDERSON CA. 1996. Tree responses to elevated CO_2 and implications for forests. In: Koch GWM, H.A., ed. Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems: Academic Press. 1-21.

NORBY RJ, WULLSCHLEGER SD, GUNDERSON CA, JOHNSON DW, and CEULEMANS R. 1999. Tree responses to rising CO_2 in field experiments: implications for the future forest. Plant, Cell and Environment 22: 683-.

NOWAK RS, ELLSWORTH DS, and SMITH SD. 2004. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO_2 – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? New Phytologist 162: 253-280.

OBARA M, KAJIURA M, FUKUTA Y, YANO M, HAYASHI M, YAMAYA T, and SATO T. 2001. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Experimental Botany 52: 1209-1217.

OGREN WL, and CHOLLET R. 1982. Photorespiration. Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism, and Plant Productivity.: Academic Press, Inc. 191-230.

OKSANEN E, SOBER J, and KARNOSKY DF. 2001. Impacts of elevated CO_2 and/or O_3 on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. Environmental Pollution 115: 437-446.

OREN R, and PATAKI DE. 2001. Transpiration in response to variation in microclimate and soil moisture in southeastern deciduous forests. Oecologia 127 (4): 549-559.

PATERSON AH, LANDER ES, HEWITT JD, PETERSON S, LINCOLN SE, and TANKSLEY SD. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335 (6192): 721-726.

PAUL MJ, and PELLNY TK. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. Journal of Experimental Botany 54: 539-547.

PAYAN E. 1982. Contribution à l'étude de la croissance rythmique chez de jeunes chênes pédonculés, Quercus pedunculata ehrh. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées, Clermont-Ferrand 2 ; 167p.

PENUELAS J, and AZCON-BIETO J. 1992. Changes in leaf $\Delta^{13}C$ of herbarium plant species during the last 3 centuries of CO_2 increase. Plant, Cell and Environment 15: 485-489.

PENUELAS J, and ESTIARTE M. 1997. Trends in plant carbon concentration and plant demand for nitrogen throughout this century. Oecologia 109: 69-73.

PETIT JR, JOUZEL J, RAYNAUD NI, BARNOLA J-M, BASILE I, BENDERS M, CHAPPELLAZ J, DAVIS M, DELAYGUE G, DELMOTTE M, KOTLYAKOV VM, LEGRAND M, LIPENKOV VY, LORIUS C, RITZ C, SALTZMAN E, and STIEVENARD M. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420000 years from the Vostok ice core, Antarctica. Nature 399: 429-432.

PETTERSSON R, and McDONALD AJS. 1992. Effects of elevated carbon dioxide concentration on photosynthesis and growth of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) at optimal nutrition. Plant, Cell and Environment 15: 911-919.

PICON C, GUEHL J-M, and AUSSENAC G. 1996a. Growth dynamics, transpiration and water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO_2 and drought. Annals of Forest Science 53: 431-446.

PICON C, GUEHL J-M, and FERHI A. 1996b. Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (Pinus pinaster) and drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO_2 concentrations. Plant, Cell & Environment 19: 182-190.

PICON C, FERHI A, and GUEHL J-M. 1997. Concentration and $\delta^{13}C$ of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO_2 and drought. Journal of Experimental Botany 48: 1547-1556.

PLOMION C, BAHRMAN N, DUREL CE, and O'MALLEY DM. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. Heredity 74 (6): 661-668.

PLOMION C, DUREL CE, and O'MALLEY DM. 1996. Genetic dissection of height in maritime pine seedlings raised under accelerated growth conditions. Theorical Applied Genetics 93: 849-858.

POLLE A, Mc KEE IF, and BLASCHKE L. 2001. Altered physiological and growth responses to elevated [CO_2] in offspring from holm oak (*Quercus ilex* L.) mother trees with lifetime exposure to naturally elevated [CO_2]. Plant, Cell and Environment 24: 1075-1083.

POLLEY HW, JOHNSON HB, MARINO BD, and MAYEUX HS. 1993. Increase in C3 plant water-use efficiency and biomass over Glacial to present concentrations. Nature 361: 61-64.

PONTON S, DUPOUEY JL, BREDA N, BODENES C, and DREYER E. 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. Plant, Cell & Environment 24: 861-868.

POORTER H, VAN BERKEL Y, BAXTER R, DEN HERTOG J, DIJKSTRA P, GIFFORD RM, GRIFFIN KL, ROUMET C, ROY J, and WONG SC. 1997. The effect of elevated CO_2 on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C3 species. Plant, Cell and Environment 20: 472-482.

PREGITZER KS, ZAK DR, CURTIS PS, KUBISKE ME, TEERI JA, and VOGEL CS. 1995. Atmospheric CO_2, soil nitrogen and turnover of fine roots. New Phytologist 129: 579-585.

PRICE AH, CAIRNS AJ, HORTON P, JONES HG, and GRIFFITHS H. 2002. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. Journal of Experimental Botany 53: 989-1004.

PRIOUL J-L, QUARRIE S, CAUSSE M, and DE VIENNE D. 1997. Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. Journal of Experimental Botany 48: 1151-1163.

PRIOUL J-L, PELLESCHI S, SENE M, THEVENOT C, CAUSSE M, DE VIENNE D, and LEONARDI A. 1999. From QTLs for enzyme activity to candidate genes in maize. Journal of Experimental Botany 50: 1281-1288.

PRITCHARD SG, ROGERS HH, PRIOR SA, and PETERSON CM. 1999. Elevated CO_2 and plant structure: a review. Global Change Biology 5: 807-837.

RADOGLOU KM, and JARVIS PG. 1990a. Effects of CO_2 enrichment on four poplar clones. I. Growth and leaf anatomy. Annals of Botany 65: 617-626.

RADOGLOU KM, and JARVIS PG. 1990b. Effects of CO_2 enrichment on four poplar clones. II. Leaf surface properties. Annals of Botany 65: 627-632.

REDDY KR, ROBANA RR, HODGES HF, LIU XJ, and Mc KINION JM. 1998. Interactions of CO_2 enrichment and temperature on cotton growth and leaf characteristics. Environmental & Experimental Botany 39: 117-129.

REICH PB, TESKEY RO, JOHNSON PS, and HINCKLEY TM. 1980. Periodic root and shoot growth in oak. Forest Science 26: 590-598.

REY A, and JARVIS PG. 1997. Long-term photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO_2 in birch (*Betula pendula* Roth.). In: MOHREN GMJ, ed. Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems.: Kluwer Academic. 87-91.

REYMOND M, MULLER B, and TARDIEU F. 2004. Dealing with the genotype x environment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. Journal of Experimental Botany 55: 2461-2472.

RIBAUT J-M, and HOISINGTON D. 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. Trends in Plant Science 3: 236-239.

ROGERS A, ELLSWORTH DS, and HUMPHRIES SW. 2001. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO_2. Journal of Experimental Botany 52: 1555-1561.

ROGERS A, and ELLSWORTH DS. 2002. Photosynthetic acclimation of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long-term growth in elevated pCO_2 (FACE). Plant, Cell & Environment 25: 851-858.

ROUMET C, GARNIER E, SUZOR H, SALAGER J-L, and ROY J. 2000. Short and long-term responses of whole-plant gas exchange to elevated CO_2 in four herbaceous species. Environmental & Experimental Botany 43: 155-169.

RYAN MG. 1991. Effects of climate change on plant respiration. Ecological Applications 1: 157-167.

SAGE RF, SHARKEY TD, and SEEMAN JR. 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO_2 in five C3 species. Plant Physiology 89: 590-596.

SAGE RF, SHARKEY TD, and SEEMAN JR. 1990a. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to light intensity and CO_2 in the C3 annuals *Chenopodium album* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology 94: 1735-1742.

SAGE RF. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO_2: the gas exchange perspective. Photosynthesis Research 39: 351-368.

SAINTAGNE C, BODENES C, BARRENECHE T, POT D, PLOMION C, and KREMER A. 2004. Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. Heredity 92: 20-30.

SALLAS L, LUOMALA E-M, UTRIAINEN J, KAINULAINEN P, and HOLOPAINEN JK. 2003. Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. Tree Physiology 23: 97-108.

SARANGA Y, MENZ M, JIANG C-X, WRIGHT RJ, YAKIR D, and PATERSON AH. 2001. Genomic dissection of Genotype x Environment interactions conferring adaptation of cotton to arid conditions. Genome Research 11: 1988-1995.

SARANGA Y, JIANG C-X, WRIGHT RJ, YAKIR D, and PATERSON AH. 2004. Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. Plant, Cell and Environment 27: 263-277.

SAURER M, SIEGWOLF RT, and SCHWEINGRUBER FH. 2004. Carbon isotope discrimination indicates improving water-use efficiency of trees in northern Eurasia over the last 100 years. Global Change Biology 10: 2109-2120.

SAXE H, ELLSWORTH DS, and HEATH J. 1998. Tansley Review No. 98 : Tree and forest functioning in an enriched CO_2 atmosphere. New Phytologist 139: 395-436.

SCALFI M, TROGGIO M, PIOVANI P, LEONARDI S, MAGNASCHI G, VENDRAMIN GG, and MENOZZI P. 2004a. A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). Theorical Applied in Genetics 108: 433-441.

SCHIMEL DS. 1998. The carbon equation. Nature 393: 208-209.

SCHMADEL-HAGEBOLLING HE, ENGEL C, SCHMITT V, and WILD A. 1998. The combined effects of CO_2, ozone and drought on rubisco and nitrogen metabolism of young oak trees (*Quercus petraea*). Chemosphere 36: 789-794.

SCHWANZ P, and POLLE A. 2001a. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (Quercus robur) and maritime pine (Pinus pinaster) grown under high CO2 concentrations. Journal of Experimental Botany 52: 133-143.

SCHWANZ P, and POLLE A. 2001b. Growth under elevated CO2 ameliorates defenses against photo-oxidative stress in poplar (*Populus alba x tremula*). Environmental & Experimental Botany 45: 43-53.

SCOTTI-SAINTAGNE C, BODENES C, BARRENECHE T, BERTOCCHI E, PLOMION C, and KREMER A. 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. Theorical Applied in Genetics 109: 1648-1659.

SCOTTI-SAINTAGNE C, BERTOCCHI E, BARRENECHE T, KREMER A, and PLOMION C. 2005. Quantitative trait loci mapping for vegetative propagation in pedunculate oak. Annals of Forest Science 62: 369-374.

SENE M, CAUSSE M, DAMERVAL D, THEVENOT C, and PRIOUL J-L. 2000. Quantitative trait loci affecting amylose, amylopectine and starch content in maize recombinant inbred lines. Plant Physiology and Biochemistry 38: 459-472.

SENEWEERA SP, and CONROY JP. 2005. Enhanced leaf elongation rates of wheat at elevated CO_2 : is it related to carbon and nitrogen dynamics within the growing leaf blade ? Environmental & Experimental Botany 54(2) : 174-181.

SENEWEERA S, CONROY J, ISHIMARU K, GHANNOUM O, OKADA M, LIEFFERING M, KIM HY, and KOBAYASHI K. 2002. Changes in source-sink relations during development influence photosynthetic acclimation of rice to free air CO_2 enrichment (FACE). Functional Plant Biology 29: 945-953.

SEWELL MM, and NEALE DB. 2000. Mapping quantitative traits in forest trees. In: Jain SM and Minocha SC, eds. Molecular Biology of Woody Plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 407-423.

SEWELL MM, DAVIS MF, TUSKAN GA, WHEELER NC, ELAM CC, BASSONI DL, and NEALE DB. 2002. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). II. Chemical wood properties. Theorical Applied in Genetics 104: 214-222.

SHAPIRO BM, and STADTMAN ER. 1970. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. Annual Review of Microbiology 24: 501-524.

SHARKEY TD. 1988. Estimating the rate of photorespiration in leaves. Physiologia Plantarum 73: 147-152.

SHOLTIS JD, GUNDERSON CA, NORBY RJ, and TISSUE DT. 2004. Persistent stimulation of photosynthesis by elevated CO_2 in a sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) forest stand. New Phytologist 162: 343-354.

SICHER RC, and KREMER DF. 1996. Rubisco activity is altered in a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris* grown in elevated carbon dioxide. Environmental & Experimental Botany 36: 385-391.

SIGNORA L, GALTIER N, SKOT L, LUCAS H, and FOYER CH. 1998. Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO_2 enrichment. Journal of Experimental Botany 49: 669-680.

SIGURDSSON BD. 2001. Elevated [CO2] and nutrient status modified leaf phenology and growth rythm of young *Populus trichocarpa* trees in a three-year field study. Trees 15(7) : 403-413.

SIMON MR. 1994. Gene action and heritability for photosynthetic activity in two wheat crosses. Euphytica 76: 235-238.

SMEEKENS S, and ROOK F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. Plant Physiology 115: 7-13.

STITT M. 1991. Rising CO_2 levels and their potential significance for carbon flow in photosyntetic cells. Plant, Cell and Environment 14: 741-762.

STITT M, and KRAPP A. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. Plant, Cell & Environment 22: 583-621.

SUN ZJ, LIVINGSTON NJ, GUY RD, and ETHIER GJ. 1996. Stable carbon isotopes as indicators of increased water use efficiency and productivity in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. Plant, Cell and Environment 19: 887-894.

TAGU D, BASTIEN C, FAIVRE-RAMPANT P, GARBAYE J, VION P, VILLAR M, and MARTIN F. 2005. Genetic analysis of phenotypic variation for ectomycorrhiza formation in an interspecific F1 poplar full-sib family. Mycorrhiza 15: 87-91.

TAIRA M, VALTERSSON U, BURKHARDT B, and LUDWIG RA. 2004. *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. The Plant Cell 16: 2048–2058.

TAYLOR G, STREET NR, TRICKER PJ, SJÖDIN A, GRAHAM L, SKOGSTRÖM O, CALFAPIETRA C, SCARASCIA-MUGNOZZA G, and JANSSON S. 2005. The transcriptome of Populus in elevated CO_2. New Phytologist 167: 143-154.

TAYLOR G, TRICKER PJ, ZHANG FZ, ALSTON VJ, MIGLIETTA F, and KUZMINSKY E. 2003. Spatial and temporal effects of free-air CO_2 enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion, and cell production in a closed canopy of poplar. Plant Physiology 131: 177-185.

TCHERKEZ G, and FARQUHAR GD. 2005. Carbon isotope effect predictions for enzymes involved in the primary carbon metabolism of plant leaves. Functional Plant Biology 32: 277–291.

TEULAT B, MONNEVEUX P, WERY J, BORRIES C, SOUYRIS I, CHARRIER A, and THIS D. 1997. Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. New Phytologist 137: 99-107.

TEULAT B, MERAH O, SIRAULT X, BORRIES C, WAUGH R, and THIS D. 2002. QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. Theorical Applied in Genetics 106: 118-126.

THAMARUS K, GROOM K, BRADLEY A, RAYMOND CA, SCHIMLECK LR, WILLIAMS ER, and MORAN GF. 2004. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. Theorical Applied in Genetics 109: 856-864.

THOMAS RB, and STRAIN BR. 1991. Root restriction as a factor in photosynthetic acclimation of cotton seedlings grown in elevated carbon dioxide. Plant Physiology 96: 627-634.

TISSUE DT, THOMAS RB, and STRAIN BR. 1993. Long-term effects of elevated CO_2 and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. Plant, Cell and Environment 16: 859-865.

TISSUE RB, THOMAS FM, and STRAIN BR. 1997. Atmospheric CO_2 enrichment increases growth and photosynthesis of *Pinus taeda*: a 4 year experiment in the field. Plant, Cell and Environment 20: 1123-1134.

TJOELKER MG, OLEKSYN J, and REICH PB. 1998a. Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO_2 and temperature. Tree Physiology 18: 715-726.

TJOELKER MG, OLEKSYN J, and REICH PB. 1998b. Temperature and ontogeny mediate growth response to elevated CO_2 in seedlings of five boreal tree species. New Phytologist 140: 197-210.

TJOELKER MG, OLEKSYN J, and REICH PB. 1999. Acclimation of respiration to temperature and CO_2 in seedlings of boreal tree species in relation to plant size and relative growth rate. Global Change Biology 49: 679-691.

TOGNETTI R, JOHNSON JD, MICHELOZZI M, and RASCHI A. 1998. Response of foliar metabolism in mature trees of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* to long-term elevated CO_2. Environmental & Experimental Botany 39: 233-245.

TRICKER PJ, CALFAPIETRA C, KUZMINSKY E, PULEGGI R, FERRIS R, NATHOO M, PLEASANTS LJ, ALSTOON V, DE ANGELIS P, and TAYLOR G. 2004. Long-term acclimation of leaf production, development, longevity and quality following 3 yr exposure to free-air CO_2 enrichment during canopy closure in Populus. New Phytologist 162: 413-426.

TSAROUHAS V, GULLBERG U, and LAGERCRANTZ U. 2004. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) affecting autumn freezing resistance and phenology in Salix. Theorical Applied in Genetics 108: 1335-1342.

TUHKANEN E-M, LAITINEN K, KELLOMÄKI S, LAPPI J, and VAPAAVUORI E. 1997. Effects of high CO_2 and N fertilization on Scots pine needles. In: al. GMJMe, ed. Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems: Kluwer Academic. 75-80.

URBAN O. 2003. Physiological impacts of elevated CO_2 concentration ranging from molecular to whole plant responses. Photosynthetica 41: 9-20.

VAN BUITJENEN JP. 2001. Genomics and quantitative genetics. Canadian Journal of Forest Research 31: 617-622.

VAN OOSTEN J-J, AFIF D, and DIZENGREMEL P. 1992. Long -term effects of a CO_2 - enriched atmosphere on enzymes of the primary carbon metabolism of spruce trees. Plant Physiology and Biochemistry 30: 541-547.

VAN OOSTEN JJ, and BESFORD RT. 1994. Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO_2-rapid down regulation of Rubisco small subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. Journal of Plant Physiology 143: 306-312.

VAN OOSTEN JJ, WILKINS D, and BESFORD RT. 1994. Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO_2 is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO_2 ? Plant, Cell and Environment 17, 913-923.

VISSCHER PM, THOMPSON R, and HALEY CS. 1996. Confidence Intervals in QTL mapping by bootstrapping. Genetics 143: 1013-1020.

VIVIN P, GROSS P, AUSSENAC G, and GUEHL J-M. 1995. Whole-plant CO_2 exchange, carbon partitioning and growth in *Quercus robur* seedlings exposed to elevated CO_2. Plant Physiology and Biochemistry 33: 201-211.

VIVIN P, GUEHL J-M, CLEMENT A, and AUSSENAC G. 1996. The effects of elevated CO_2 and water stress on whole plant CO_2 exchange, carbon allocation and osmoregulation in oak seedlings. Annals of Forest Science 53: 447-459.

VU JCV. 2005. Acclimation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf photosynthesis to elevated growth CO_2 and temperature. Environmental & Experimental Botany 53: 85-95.

VU JCV, BAKER JT, PENNANEN AH, ALLEN LHJ, BOWES G, and BOOTE KJ. 1998. Elevated CO_2 and water deficit effects on photosynthesis, ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice. Physiologia Plantarum 103: 327-339.

WAN S, and LUO Y. 2003. Substrate regulation of soil respiration in a tallgrass prairie: Results of a clipping and shading experiment. Global Biogeochemical Cycles 17 (2): 23-31.

WAN S, NORBY RJ, PREGITZER KS, LEDFORD J, and O'NEILL EG. 2004. CO_2 enrichment and warming of the atmosphere enhance both productivity and mortality of maple tree fine roots. New Phytologist 162: 437-446.

WANG X, ANDERSON OR, and GRIFFIN KL. 2004. Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO_2 concentration. Environmental & Experimental Botany 51: 21-31.

WARD JK, and STRAIN BR. 1999. Elevated CO_2 studies: Past, present and future. Tree Physiology 19: 211-220.

WARREN CR, CHEN JL, and ADAMS MA. 2000a. Effetc of N source on concentration of Rubisco in *Eucalyptus diversicolor*, as measured by capillary electrophoresis. Physiologia Plantarum 110: 52-58.

WARREN CR, ADAMS MA, and CHEN Z. 2000b. Is photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? Australian Journal of Plant Physiology 27: 407-441.

WARREN CR, and ADAMS MA. 2001. Distribution of N, rubisco and photosynthesis in *Pinus pinaster* and acclimation to light. Plant, Cell and Environment 24: 597-609.

WARREN CR, and ADAMS MA. 2002. Phosphorus affects growth and partitioning of N to Rubisco in *Pinus pinaster*. Tree Physiology 22: 11-19.

WARREN CR, DREYER E, and ADAMS MA. 2003. Photosynthesis-Rubisco relationships in foliage of *Pinus sylvestris* in response to nitrogen supply and the proposed role of Rubisco and amino acids as nitrogen stores. Trees 17: 359-366.

WEBBER AN, NIE G-Y, and LONG SP. 1994. Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO_2. Photosynthetis Research 39: 413-425.

WENG C, KUBISIAK TL, NELSON CD and STINE M. 2002. Mapping quantitative trait loci controlling early growth in a (longleaf pine x slash pine) x slash pine BC1 family. Theorical Applied in Genetics 104 (5): 852-859.

WHITE A, and CANNELL M. 1999. The impacts of climate change on natural vegetation.

WINGLER A, LEA PJ, and LEEGOOD RC. 1997. Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase. Planta 202: 171-178.

WINTER HC, POWELL GK, and DEKKER EE. 1982. Glutamine Synthetase of germinating peanuts. Plant Physiology 69: 41-47.

WOODWARD FI. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO_2 from pre-industrial levels. Nature 327: 617-618.

WOODWARD FI. 1993. Plants responses to past concentrations of CO_2. Vegetatio 104/105: 145-155.

WOODWARD FI, and KELLY GJ. 1995. The influence of CO_2 concentration on stomatal density. New Phytologist 131: 311-327.

WOODWARD FI. 2002. Potential impacts of global elevated CO_2 concentrations on plants. Current Opinion in Plant Biology 5: 207-211.

WU R, HU X, and HAN Y. 2000. Molecular genetics and developmental physiology: Implications for designing better forest crops. Critical Reviews in Plant Sciences 19: 377-393.

WU R, MA C-X, ZHAO W, and CASELLA G. 2003. Functional mapping for quantitative trait loci governing growth rates: A parametric model. Physiological Genomics 14: 241-249.

WULLSCHLEGER S, NORBY RJ, and HENDRIX DL. 1992. Carbon exchange rates, chlorophyll content, and carbohydrate status of two forest tree species exposed to carbon dioxide enrichment. Tree Physiology 10: 21-31.

WULLSCHLEGER SD, ZISKA LH, and BUNCE JA. 1994. Respiratory responses of higher plants to atmospheric CO_2 enrichment. Physiologia Plantarum 90: 221-229.

WULLSCHLEGER SD, NORBY RJ, LOVE JC, and RUNCK C. 1997. Energetic costs of tissue construction in yellow poplar and white oak trees exposed to long-term CO_2 enrichment. Annals of Botany 80: 289-297.

WULLSCHLEGER S, TSCHAPLINSKI TJ, and NORBY RJ. 2002. Plant water relations at elevated CO_2 - implications for water-limited environments. Plant, Cell and Environment 25: 319-331.

YELLE S, BEESON RCJ, TRUDEL MJ, and GOSSELIN A. 1989. Acclimation of two tomato species to high atmospheric CO_2. II. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvatecarboxylase. Plant Physiology 90: 1473-1477.

YELLE S, BEESON RCJ, TRUDEL MJ, and GOSSELIN A. 1989. Acclimation of two tomato species to high atmospheric CO_2. I. Sugar and Starch concentrations. Plant Physiology 90: 1465-1472.

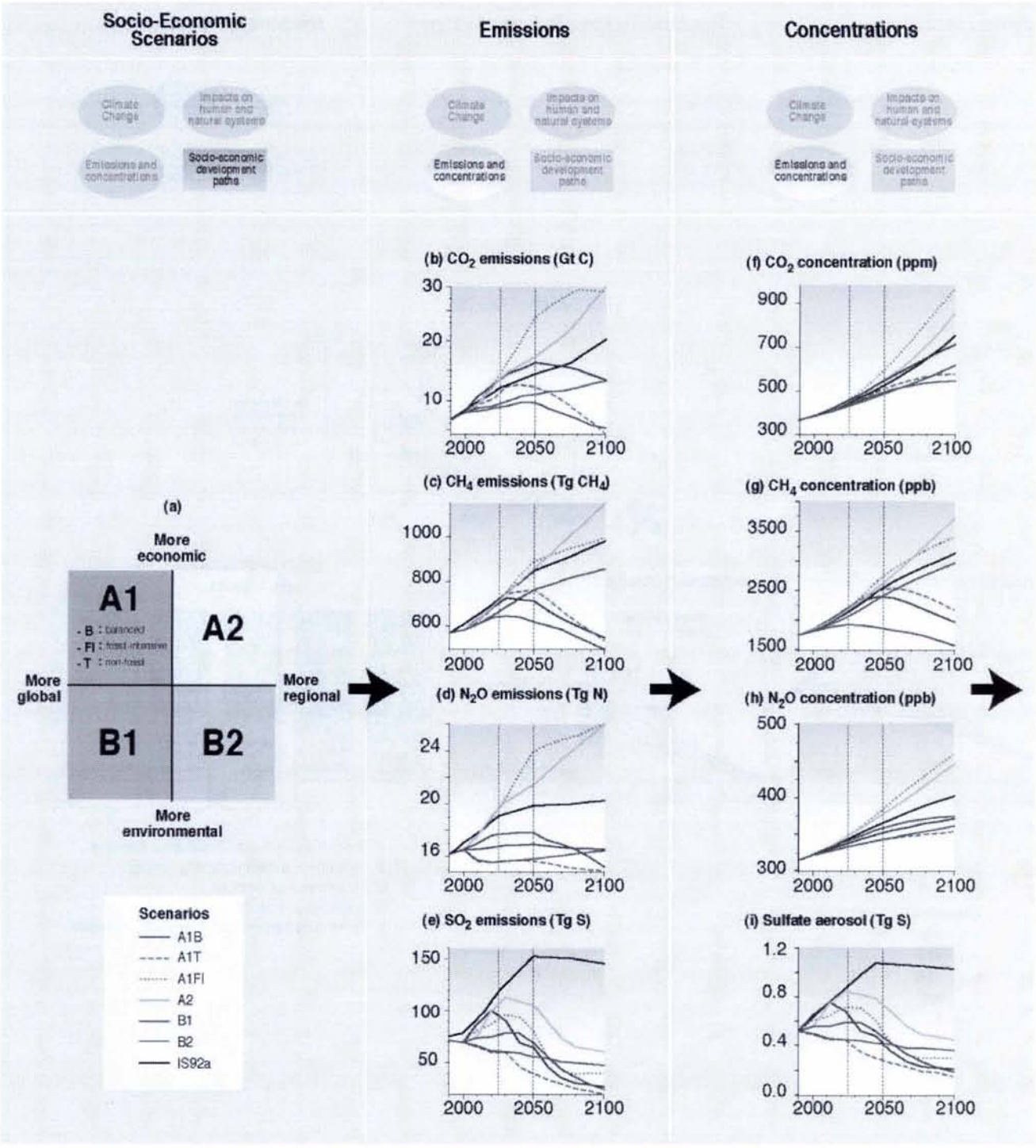
ZANETTO A, ROUSSEL G, and KREMER A. 1994. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Forest Genetics 1: 111-123.

ZENG Z-B. 1994. Precision Mapping of Quantitative trait loci. Genetics 136: 1457-1468.

ZHANG J, and MARSHALL JD. 1995. Variation in carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange among populations of *Pseudotsuga menziesii and Pinus ponderosa* in different environments. Functional Ecology 9: 402-412.

ZHANG S, and DANG Q-L. 2005. Effects of soil temperature and elevated atmospheric CO_2 concentration on gas exchange, in vivo carboxylation and chlorophyll fluorescence in jack pine and white birch seedlings. Tree Physiology 25: 523-531.

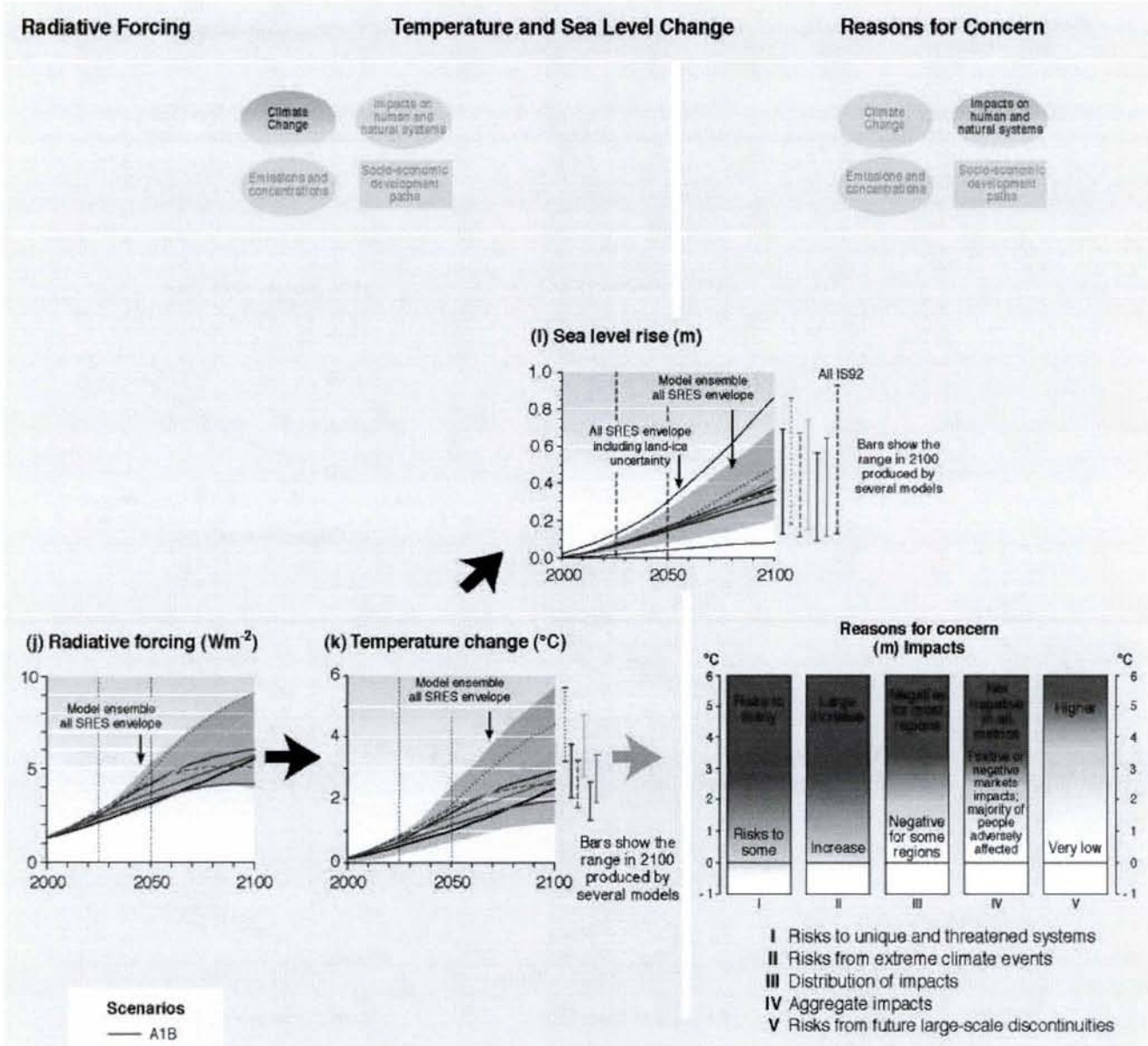
ANNEXES



A1FI, A1T and A1B

The A1 storyline and scenario family describes a future world of very rapid economic growth, global population that peaks in mid-century and declines thereafter, and the rapid introduction of new and more efficient technologies. Major underlying themes are convergence among regions, capacity-building, and increased cultural and social interactions, with a substantial reduction in regional differences in per capita income. The A1 scenario family develops into three groups that describe alternative directions of technological change in the energy system. The three A1 groups are distinguished by their technological emphasis: fossil intensive (A1FI), non-fossil energy sources (A1T), or a balance across all sources (A1 B) (where balanced is defined as not relying too heavily on one particular energy source, on the assumption that similar improvment rates apply to all energy supply and end use technologies).

Scenari proposés par l'IPCC sur l'évolution des émissions de polluants et leur impact sur l'environnement et le climat, en fonction de différents schémas de développements des sociétés humaines. http://www.ipcc.ch/present/presentations.htm



A2

The A2 storyline and scenario family describes a very heterogeneous world. The underlying theme is self-reliance and preservation of local identities. Fertility patterns across regions converge very slowly, which results in continuously increasing population. Economic development is primarily regionally oriented and per capita economic growth and technological change more fragmented and slower than other storylines.

B1

The B1 storyline and scenario family describes a convergent world with the same global population that peaks in mid-century and declines thereafter, as in the A1 storyline, but with rapid change in economic structures toward a service and information economy, with reductions in material intensity and the introduction of clean and resource-efficient technologies. The emphasis is on global solutions to economic, social, and environmental sustainability, including improved equity, but without additional climate initiatives.

B2

The B2 storyline and scenario family describes a world in which the emphasis is on local solutions to economic, social, and environmental sustainability. It is a world with continuously increasing global population, at a rate lower than A2, intermediate levels of economic development, and less rapid and more diverse technological change than in the B1 and A1 storylines. While the scenario is also oriented towards environmental protection and social equity, it focuses on local and regional levels.

Mesures de discrimination isotopique

Principe des mesures de discrimination isotopique contre le ^{13}C

L'air ambiant est composé pour 0,038 % environ de dioxyde de carbone, dont l'atome de carbone présente deux types d'isotopes stables. Le ^{12}C représente 98,89 % du pool de carbone terrestre, une grande partie des 1,11 % restant étant du ^{13}C (Guehl *et al.*, 1995), le ^{14}C restant minoritaire.

Des mesures de discrimination isotopique réalisées sur des plantes en C3 montrent que celles-ci discriminent fortement contre le ^{13}C, les valeurs de composition isotopique relative étant particulièrement basses (Guehl *et al.*, 1995). A chaque processus d'incorporation ou de relargage de carbone, une discrimination est exercée contre l'un ou l'autre des isotopes : les capacités de diffusion ou dissolution, les réactions enzymatiques ou leurs vitesses dérivent souvent de la différence de masse entre les isotopes, et de la disponibilité de chacun d'entre eux dans l'environnement immédiat (Deleens *et al.*, 1993). Les principales étapes de discrimination sont la diffusion du CO_2 au niveau des stomates (**a = 4.4 ‰** , Craig, 1954) et l'assimilation du CO_2 intracellulaire par les enzymes carboxylantes des plantes en C3, la RubisCO et la PEPc (valeur standard **b= 27‰**, Farquhar & Richards, 1984).

Calcul de la discrimination

La mesure réalisée par spectrométrie de masse isotopique donne la composition isotopique relative $\delta^{13}C$ de l'échantillon en fonction d'un standard universel (la PeeDee Belemnite, PDB), selon l'expression :

$$\delta^{13}C\ (‰) = \frac{R_{échantillon} - R_{standard}}{R_{standard}} . 10^3$$

où **R** est le rapport molaire isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon ou du standard PDB (de valeur : $R_{standard} = 0.0112372$).

La discrimination isotopique de l'échantillon s'exerce contre le ^{13}C de l'air ambiant, par le jeu des différentes étapes dans l'assimilation du carbone (entrée par le stomate, diffusion, assimilation). On définit la discrimination isotopique Δ par la relation:

$$\Delta\ (‰) = \frac{\delta_{air} - \delta_{plante}}{1 + 10^{-3}.\ \delta_{plante}}$$

La composition isotopique du CO_2 de l'air extérieur varie selon le milieu environnant la plante, la valeur " standard " de l'air libre étant – 8 ‰ (Guehl *et al.*, 1995).

Au niveau foliaire, compte tenu de la discrimination exercée contre le ^{13}C au niveau de la diffusion du CO_2 à travers les stomates (a) et lors de la carboxylation (b), Farquhar *et al.* (1982) ont exprimé de manière simple la discrimination isotopique exercée de manière effective à l'échelle foliaire :

$$\Delta\ (‰) = a + (b - a).\ Ci/Ca$$

Ca et **Ci** étant respectivement les concentrations en CO_2 de l'air et dans les espaces intercellulaires, en mmol/mol.

Efficience d'utilisation en eau (WUE)

Elle peut être calculée à différentes échelles, de la population végétale à la feuille individuelle.

Au niveau d'une plante entière, l 'efficience d 'utilisation en eau est définie par le rapport entre le gain de biomasse et l 'eau perdue par transpiration. C 'est une donnée intégrée dans le temps.

Au niveau foliaire, l 'efficience d 'utilisation en eau est définie par le rapport entre l 'assimilation carbonée nette A_n et la transpiration E (en $mmol.m^{-2}.s^{-1}$). C'est une donnée instantanée.

$$WUE_{inst} = A_n / E$$

Une expression dérivée de la loi de Fick nous donne la transpiration selon la formule :

$$E = g_s . (W_i - W_a) = g_s . v$$

où g_s est la conductance stomatique à la vapeur d 'eau ($mmol.m^{-2}.s^{-1}$), W_i et W_a les fractions molaires de vapeur d 'eau respectivement dans l 'espace intercellulaire et dans l 'air (en $mmol.mol^{-1}$), et v la différence entre les deux.

On peut également calculer l'assimilation carbonée nette selon l 'expression:

$$A_n = g . (Ca - Ci)$$

où g est la conductance stomatique au CO_2 , avec $g = g_s /1.6$

Compte tenu de ces différentes équations et de l 'expression de la discrimination isotopique à l 'échelle de la feuille, l'efficience d 'utilisation en eau instantanée peut donc être calculée à partir des concentrations en CO_2 ou du Δ selon les relations :

$$WUE_{inst} = \frac{g . (Ca - Ci)}{g_s . v} = \frac{Ca - Ci}{v} = \frac{Ca}{1.6\, v} \times \frac{b - \Delta}{b - a}$$

Principe de la Recherche de QTLs

La détection de QTLs d'une population se base sur la carte génétique des parents dont sont issus les génotypes étudiés.Les marqueurs utilisés pour la construction de ces cartes génétiques sont très généralement des séquences d'ADN (RAPD, RFLP, microsatellites...). Les microsatellites présentent un avantage particulier, car ils sont conservés dans l 'évolution des espèces. Ils permettent donc de comparer des cartes d 'espèces différentes.

Lorsqu'un QTL est lié sur le génome à un marqueur donné, on doit retrouver une covariance entre le génotype (connu grâce au marqueur) et le caractère quantitatif (Mitchell-Olds, 1995). Par conséquent, si on retrouve une liaison statistique entre la présence de l'allèle d'un marqueur et la variation quantitative d'un caractère, il est donc possible de remonter à la localisation d'un QTL de ce trait sur le génome, à proximité du marqueur.

Si on dispose de données quelconques sur une population importante d'arbres plein-frères (de parents identiques), il est ainsi possible de localiser par des tests statistiques une ou plusieurs régions de la carte génétique impliquées dans l'expression quantitative d'un caractère mesuré, et donc d'observer des liaisons génétiques entre certains caractères lorsque les QTLs colocalisent, soit que le processus de régulation est commun, soit que ces caractères sont liés au niveau métabolique (de Vienne, 1990). La recherche de QTLs est toutefois possible seulement si la variabilité génétique du caractère est importante afin de pouvoir réaliser les tests statistiques, comme le sont par exemple la croissance et la discrimination isotopique (Zhang & Marshall, 1995).

Les QTLs peuvent ainsi être utilisés dans une étude purement théorique de la biologie de l'arbre, ou dans l'étude d'une adaptation de l'individu à son environnement (Mitchell-Olds, 1995) en révélant les interactions génotype x environnement.

Technique de l'analyse

1. Localisation des QTLs

La première condition nécessaire pour détecter le ou les loci correspondants à un caractère quantitatif est que celui-ci montre un polymorphisme important dans la population étudiée (Prioul *et al.,* 1997). Si les deux parents présentent eux-mêmes une différence phénotypique pour ce caractère, alors la descendance engendrée doit présenter un polymorphisme suffisant pour la recherche de QTL grâce au phénomène de transgression (théorie de l'héritage de caractères complexes). En retour, si lors d'une étude un QTL est faiblement détecté, c'est peut-être qu'il présente une faible variabilité génétique.

➢Les modèles de recherche

Deux méthodes peuvent être employées pour localiser les QTLs : soit un seul marqueur supposé en liaison avec le QTL est étudié, soit deux marqueurs supposés bordant du QTL (Plomion, 1995).

Plus la carte génétique réalisée est complète (i.e. plus il y a de marqueurs qui couvrent le génome), plus il y a de chances qu'un QTL soit détecté (de Vienne & Causse, 1997 ; Boichard *et al.*, 2000). On utilise le plus souvent des marqueurs codominants pour localiser les QTLs : pour tous les marqueurs connus sur la carte génétique, on réalise une analyse statistique de liaison avec le caractère phénotypique observé (Mitchell-Olds, 1995).

Modèle à marqueur individuel : on utilise un test t simple pour distinguer les individus qui portent les différents allèles de ce marqueur. Cependant, trois problèmes sont posés par cette technique. 1. Lorsque la distance entre le marqueur et le QTL est importante, la liaison peut être invisible, ou la distance entre les deux faussée (phénomènes de double recombinaison, ...). Ce risque d'erreur peut être partiellement évité lorsque l'on soupçonne un gène particulier (gène candidat) comme responsable du trait quantitatif, et pouvant ainsi être confondu avec le QTL. 2. Elle ne permet pas de localiser avec précision le QTL sur le génome, d'autant plus quand la densité de marqueurs est faible sur la carte (de Vienne & Causse, 1997). 3.La technique ne permet pas de différencier un QTL à fort effet mais éloigné du marqueur d'un QTL à effet faible mais proche du marqueur, les deux cas montrant un même effet apparent (Boichard *et al.*, 2000).

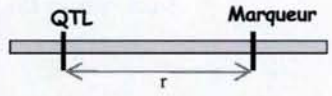
Modèle à marqueur individuel : on réalise un croisement de deux parents homozygotes P1 et P2 pour 2 loci (M pour un marqueur choisi, et Q pour un QTL supposé).

	P1	*P2*	
Génotype	**M1Q1/M1Q1**	**M2Q2/M2Q2**	⇒ *Descendance F1* M1Q1/M2Q2
Gamètes	**M1Q1**	**M2Q2**	

Puis *Backcross*: F1 x P1 (ou P 2)

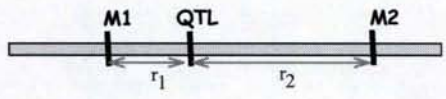
	M1Q1 (parental)	**M2Q2 (parental)**	**M1Q2 (recombinant)**	**M2Q1 (recombinant)**
M1Q1	**M1Q1/M1Q1**	**M1Q1/M2Q2**	**M1Q1/M1Q2**	**M1Q1/M2Q1**

Si M et Q sont fortement liés (distance r très faible), alors on ne trouve quasiment pas de recombinants chez les F1. Lors du backcross, le parent F1 donne donc un descendant Q1/Q1 lorsqu'il transmet M1 et Q1/Q2 lorsqu'il transmet M2 .



Modèle à deux marqueurs bordants ou cartographie d'intervalle (*Interval Mapping IM,* Lander & Botstein, 1989). Si un QTL existe en un point donné du génome, il est flanqué de part et d'autre par deux marqueurs connus. L'hypothèse nulle Ho " absence de QTL en chaque position X du génome " est donc testée systématiquement sur l'ensemble du génome, en analysant les données par groupe de liaison. Il est ainsi possible de retrouver les deux marqueurs bordant un QTL, la distance du QTL vis-à-vis de ces deux marqueurs, l'ordre entre les trois loci, et l'effet réel du QTL. Plus la distance entre les marqueurs et le QTL augmente, plus cette technique est puissante par rapport au modèle à marqueur individuel.

Modèle à marqueurs bordants : le principe de calcul est le même, excepté que le parent F1 est double hétérozygote (M1N1Q1/M2N2Q2), et donc porteur de deux haplotypes (M1N1Q1, caractéristique du parent P1, et M2N2Q2, caractéristique du parent P2) si on considère que les trois loci sont fortement liés.



➢ Distance maximale entre marqueurs

La distance génétique minimale correspond au rapport 1/(4*Ne) , Ne étant le nombre d'individus testés de taille " efficace " (Plomion, 1995). Toutefois, les distances obtenues sont souvent très courtes et réduisent fortement la probabilité de trouver un marqueur dans cette zone. Pour être considérée comme probante, la distance maximale entre le ou les marqueurs et le QTL est en général fixée à 20 cM maximum (au-delà, les taux de recombinaison sont trop élevés) (Boichard *et al.*, 2000). En dessous de cette limite, Darvasi *et al.* (1993) considèrent qu'il n'est plus nécessaire de rechercher de nouveaux marqueurs pour améliorer la détection de QTL. Celle-ci peut par contre être affinée en augmentant le nombre d'individus testés. Toutefois, Prioul *et al.* (1997) notent que pour une cartographie ayant des intervalles entre marqueurs de 15 cM, il est difficile de déterminer si la présence de plusieurs QTL à un même locus est due à l'effet pléiotrope d'un seul et même QTL (régulation de plusieurs paramètres par un seul gène) ou s'il y a la présence de plusieurs QTL très proches impliqués chacun dans la régulation d'un seul paramètre.

Un QTL est donc d'autant plus facilement détecté qu'un grand nombre d'individus est étudié, que le ou les loci impliqués ont un effet majeur, et que le niveau de saturation de la carte est important (Prioul *et al.*, 1997).

➢ Effet des QTLs

Un des éléments fournis par l'analyse QTL est l'effet de celui-ci sur le caractère étudié. L'effet d'un QTL peut d'abord se caractériser par l'amplitude de variation du trait quantitatif auquel il correspond. Toutefois, il existe une faible probabilité pour qu'une recombinaison se produise entre le marqueur et le QTL, et donc que l'on sous-estime l'effet réel du QTL (Prioul *et al.*, 1997). Peuvent se produire aussi une additivité des effets entre eux, ou inversement une dominance d'un effet sur un autre. Le mode de recherche des QTLs doit permettre, via de multiples combinaisons des données, de considérer individuellement chaque QTL et son effet propre.

➢ Les corrélations entre QTLs

Deux QTLs peuvent être corrélés soit physiquement (à faible distance l'un de l'autre sur le génome), soit par leurs effets exprimés par une variation des traits quantitatifs. Dans le premier cas, il se peut qu'un seul QTL soit détecté, dont la position serait à cheval sur les deux QTLs liés (Martinez & Curnow, 1992), ou aucun si leurs effets sont opposés (Jansen & Stam, 1994). L'étude doit pouvoir permettre alors de localiser chacun des QTLs en prenant comme hypothèse de départ la présence de deux QTLs liés sur un groupe de liaison donné. Dans le second cas, la corrélation peut être directe (un QTL contrôlant un caractère influencera l'expression d'un gène impliqué dans un autre caractère) ou indirecte, via un élément régulateur commun (même substrat pour les enzymes produites...).

2. *Gènes candidats*

Après la première phase de recherche, seule la localisation et l'effet d'une portion du génome sont connus. Pour déterminer la nature exacte du gène impliqué dans l'expression quantitative ainsi que son mode de fonctionnement, on recherche parmi les gènes connus ceux qui pourraient correspondre au QTL localisé.

Il existe trois types de gènes candidats (Milan, 2000; Plomion, 2000): fonctionnels ou physiologiques (lorsqu'on connaît le caractère et le rôle du gène), expressionnels (via l'étude de l'expression du protéome), et positionnels (gènes de fonction connue ou non, dont on connaît la localisation exacte sur le génome).

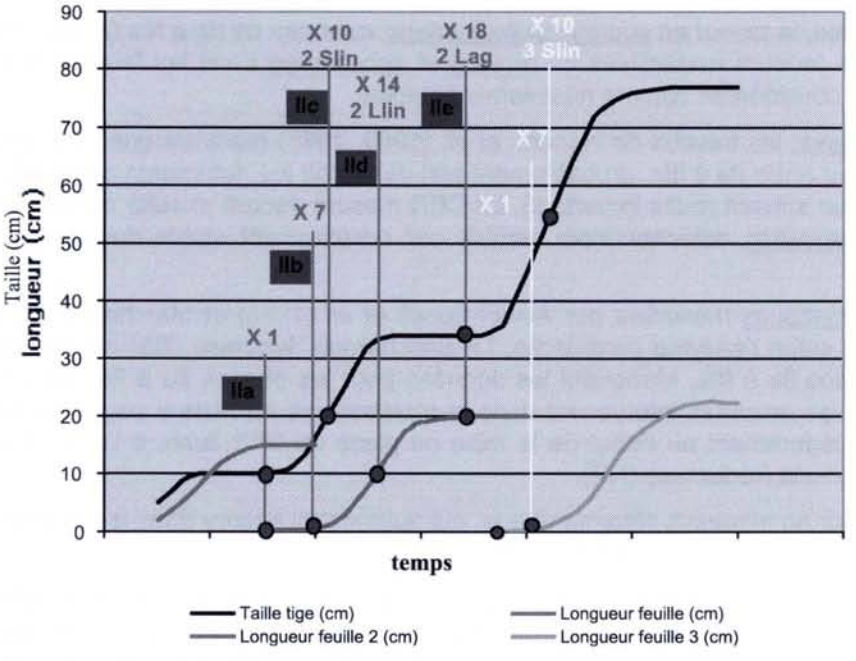
Lorsque l'identité du gène est pressentie, il faut vérifier (Plomion, 2000) 1.que la quantité ou l'activité d'une protéine induite par ce gène varie effectivement 2.qu'un QTL contrôlant l'activité ou la quantité de cette protéine (PQL : Protein Quantity Locus) soit détecté dans la région du génome où se trouve le gène candidat. Il est possible de contrôler cette hypothèse par une étude du même trait chez des individus quelconques, non liés. Si la variation quantitative de ce caractère est toujours liée au polymorphisme génétique, alors la probabilité pour que le gène corresponde effectivement au QTL est augmentée (Prioul *et al.*, 1997). De la même façon, il est possible d'affiner la recherche en tentant de localiser les portions du gène impliquées dans la variation quantitative du trait.

Détermination de la période de prélèvement sur les pousses de chênes pédonculés

Les différentes espèces de chêne, y compris le chêne pédonculé, présentent un mode de croissance semi-déterminé : les arbres mettent en place une série d'unités de croissance ou flushs au cours de la saison de croissance, plutôt qu'une pousse unique et régulière sur l'année (Reich *et al.*, 1980). Cependant, l'organogenèse est continue, et la phase de repos du bourgeon terminal entre deux pousses n'est qu'apparente. Le nombre de pousses s'élève traditionnellement à 3, parfois 4 ou plus si les conditions environnementales sont très favorables à l'arbre (Guehl *et al.*, 1994). La mise en place des différents étages foliaire est particulière chez ce genre végétal, car les entre-nœuds (ou tiges) ont une croissance décalée par rapport à celle des feuilles. Sur une pousse ou flush, différents types de feuilles sont trouvées avec, de bas en haut, des écailles (4 à 6), des feuilles assimilatrices (6 à 12), et enfin des feuilles à limbe avorté (2 à 3) (voir Champagnat *et al.*,1986 ; Alatou *et al.*,1989). Cette hétéroblastie serait liée à la modulation de la fonction de puits du bourgeon terminal au cours du développement (Alatou *et al.*, 1989). Les feuilles seraient également des puits avant même leur étalement. Enfin, Champagnat *et al.* (1986) décrivent le système racinaire comme un puits permanent, ayant une croissance continue et régulière à l'inverse des autres organes.

Les étapes de la croissance

Pour décrire ce type de succession, deux index ont été élaborés. Il est possible d'établir un parallèle entre les découpages effectués par chacun, une correspondance est présentée ci-dessous.



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Représentation de l'évolution des longueurs de la tige et des feuilles au cours de la croissance du Chêne. Le graphe met en parallèle les différentes étapes de la croissance rythmique du Chêne décrites par Hanson *et al.* (1986) (Slin, Llin, Lag) et Alaoui-Sossé *et al.* (1994) (X 1, X 7, X 10, X 14, X 18) sur des périodes fictives. Les courbes de couleurs correspondent aux longueurs moyennes des feuilles des flushs 1, 2 et 3. La numérotation supérieure est utilisée pour caractériser les différentes étapes sans notion de date.

Hanson *et al.* (1986) ont défini le QMI (Quercus Morphological Index) à partir de mesures réalisées sur le Chêne rouge, et extrapolable à l'ensemble du genre *Quercus*. Ils ont suivi la vitesse de croissance des tiges et des feuilles de jeunes pousses de Chêne, et caractérisé 3 étapes principales (Slin = Linear Stem Elongation ; Llin = Linear Leaf Expension ; Lag = Flush Lag).

Alatou *et al.* (1989) et Alaoui-Sossé *et al.* (1994 ; 1996) ont utilisé sur le Chêne pédonculé un autre système de découpage qui se fonde sur les étapes de développement des individus. 5 étapes majeures y sont indiquées, pour une mise en place de flush étalée sur 3 à 4 semaines (X1= Débourrement du bourgeon correspondant au flush X les 1er et 2ème jours de croissance ; X7= Apparition des feuilles (6 à 8 jours après le début de la croissance du flush). Champagnat *et al.* (1986) décrivent ces feuilles comme petites et à croissance initiale lente, le temps que l'axe s'allonge ; X10 = Vitesse de croissance maximale de la tige - 10 jours après débourrement ; X14 = Vitesse d'étalement maximale des feuilles, arrêt de l'élongation de la tige ; X18 = Fin de l'étalement foliaire. Entrée en phase de latence jusqu'au flush suivant).

Champagnat *et al.* (1986) indiquent que, en conditions contrôlées, la durée moyenne de croissance active d'un flush est de 1 à 3 semaines, pour une durée de repos équivalente. Mais ces mêmes auteurs précisent que l'arrêt de croissance visible sur les feuilles n'est que de quelques jours avant que la pousse suivante se mette en place. En situation moins favorable pour l'arbre, cette durée de repos apparent peut être rallongée.

Mesures physiologiques réalisées durant la croissance des Chênes

L'intérêt de se référer aux différents stades de croissance des arbres est de pouvoir cibler une période pendant laquelle la physiologie foliaire est la plus stable possible, afin de pouvoir effectuer des mesures sur le maximum d'arbres au même stade de développement.

Si on se réfère au récapitulatif des travaux de recherche sur la variation de différents paramètres physiologiques au cours de la mise en place de ces flushs (voir figure), on peut distinguer plusieurs types d'évolution :

➢La Masse Sèche et la Masse Fraîche évoluent très peu des étapes **IIe** à **IIIa**, voire **IVa** (Alaoui-Sossé *et al.*, 1996 ; Marchetti *et al.*, 1995), de même que la surface foliaire spécifique (Picon *et al.*,1996).

➢Au niveau des sucres, la teneur en sucres solubles totaux varie peu de **IIe** à **IIIa** (Alaoui-Sossé *et al.*, 1994, 1996). Les teneurs respectives en amidon et saccharose dans les feuilles de la 2ème pousse peuvent être considérées comme relativement stables.

➢Pour la photosynthèse, les travaux de Hanson *et al.* (1986, 1988) montrent que l'assimilation a tendance à augmenter entre **IIe** à **IIIa**, probablement afin de fournir les nutriments nécessaires à la mise en place du flush suivant (puits important). Le CER mesuré décroît ensuite nettement après la phase **IIIa**. La respiration mitochondriale semble par contre plutôt stable durant toute cette période.

➢Les activités enzymatiques mesurées par Alaoui-Sossé *et al.* (1996) et Marchetti *et al.* (1995) varient différemment selon l'enzyme considérée. La Saccharose Synthase (SS) est par exemple stable entre les phases **IIe** à **IIIa**. Manquent les données pour les phases **IIa** à **IIe**, mais on peut déjà voir que toutes les enzymes intervenant dans le métabolisme du malate sont assez stables ou augmentent très légèrement au début de la mise en place du 3ème flush, à l'exception de la NAD-MDH et de la Nitrate Réductase (NR).

➢Pigments : La teneur en pigments chlorophylliens, qui augmentait encore dans les feuilles du 2nd flush lors de la pousse du 3ème pour Marchetti *et al.* (1995).

➢Les travaux de Vivin *et al.* (1995, 1996a, 1996b) montrent, sur la durée de la saison de végétation, que les effets du CO_2 sur les différents paramètres contrôlés sur l'arbre sont beaucoup moins sensibles en fin de saison (dans des conditions d'étude optimales pour l'arbre, l'origine de cette stabilisation serait le phénomène d'acclimatation. Il est donc intéressant d'effectuer une seconde analyse dans le courant de l'été, voire au début de l'automne.

⇨ La période intéressante pour le prélèvement débute donc par la fin de la mise en place du 2nd flush (dans notre cas, la croissance du premier flush est déterminée par les conditions antérieures au début de l'expérience), et terminant par la croissance du 3ème flush (gonflement du bourgeon).

Protocole d'extraction de la cellulose.

Jour 0	**Préparation des échantillons**	50 mg de poudre de bois parfaitement sèche sont disposés dans des petits sachets en Téflon. Des perles de couleur sont ajoutées pour pouvoir identifier l'échantillon à la fin de l'extraction.
Jour 1	**Elimination des phénols et tannins par solvants (1)**	300 ml de mélange 2 :1 (v/v) de Toluène et d'Ethanol sont préparés dans un ballon, disposé ensuite sous un soxhlet (qui peut contenir jusqu'à 50 sachets de Téflon). Le ballon est mis à chauffer jusqu'à ébullition du mélange, et le système est laissé ainsi durant 24 heures, en rajoutant du mélange de solvants si nécessaire.
Jour 2	**Elimination des phénols et tannins par solvants (2)**	Le chauffage est arrêté, et le mélange de solvants est remplacé par 300 ml d'Ethanol pur. Les échantillons et la verrerie sont soigneusement rincés à l'Ethanol, puis l'ensemble est remis à chauffer à ébullition durant 24 heures.
Jour 3	**Elimination des sucres solubles**	Les échantillons sont retirés du soxhlet, rincés à l'eau distillée, puis disposés dans 700 ml d'eau distillée bouillante. L'eau est changée au bout d'1/2 heure, puis le bain est laissé à bouillir durant 3 heures. De l'eau est rajoutée en cours d'ébullition pour maintenir le niveau.
	Elimination de la lignine (1)	Dans un erlen, 700 ml d'eau distillée sont mélangés à 7g de chlorite de sodium (NaHClO2) et 1 ml d'acide acétique glacial. Le mélange est chauffé puis maintenu à 60-70 °C. Le haut de l'erlen est fermé par une fiole jaugée mise à bouchon, qui permet de condenser les vapeurs de chlore. Les échantillons sont plongés dans ce mélange toute la nuit.
Jour 4	**Elimination de la lignine (2)**	Le bain de chlorite est changé le matin (proportions identiques à la veille). Toutes les ½ heures, 7 mg de chlorite + 1 ml d'acide acétique sont rajoutés. Cette opération est renouvelée trois fois de suite. Le dernier bain est laissé 3 heures. Les échantillons sont ensuite rincés et trempés durant une demi-heure dans de l'eau chaude afin d'éliminer les vapeurs de chlore. L'eau est changée plusieurs fois, puis les échantillons sont laissés toute la nuit sous couvert d'eau.
Jour 5	**Lavage de la cellulose et séchage**	Les échantillons sont à nouveau rincés dans de l'eau distillée chaude, puis ils sont disposés dans des boîtes de Petri, et mis à sécher au minimum une heure à 40-50 °C. Les sachets de Téflon sont enfin ouverts, et les échantillons sont triés (la cellulose doit être bien blanche).

Méthode d'étalonnage des spectrophotomètres pour la quantification des pigments.

Trois gammes sont réalisées avec des concentrations croissantes en pigment de 0 à 30 µg / ml de DMSO.

La première étape consiste à déterminer les longueurs d'ondes λmax correspondants aux pics d'absorbance maximale pour chaque pigment concentré à 2 µg par ml de DMSO (autour de 480 nm pour les caroténoïdes, 649 nm pour les Chlorophylles b, et 666 nm pour les Chlorophylles a).

On mesure ensuite l'absorbance A de chaque point de gamme aux trois λmax, et trois gammes sont ainsi tracées pour chaque pigment. Une fois toutes les valeurs entrées, la pente de la droite donne le coefficient d'absorption spécifique du pigment à la longueur d'onde donnée.

L'ensemble des gammes nous donne plusieurs informations :

a = coeff. d'absorption spécifique de la Chl.a à 666 nm

b = coeff. d'absorption spécifique de la Chl.b à 649 nm

a' = coeff. d'absorption de la Chl.a à 649 nm : a' = a * E649 /100
avec E649 = A649 * 100 / A666

b' = coeff. d'absorption de la Chl.b à 666 nm : b' = b * E666 /100
avec E666 = A666 * 100 / A649

a'' = coeff. d'absorption de la Chl.a à 480 nm : a'' = a * E480 /100
avec E480 = A480 * 100 / A666

b'' = coeff. d'absorption de la Chl.b à 480 nm : b'' = b * E480 /100
avec E480 = A480 * 100 / A649

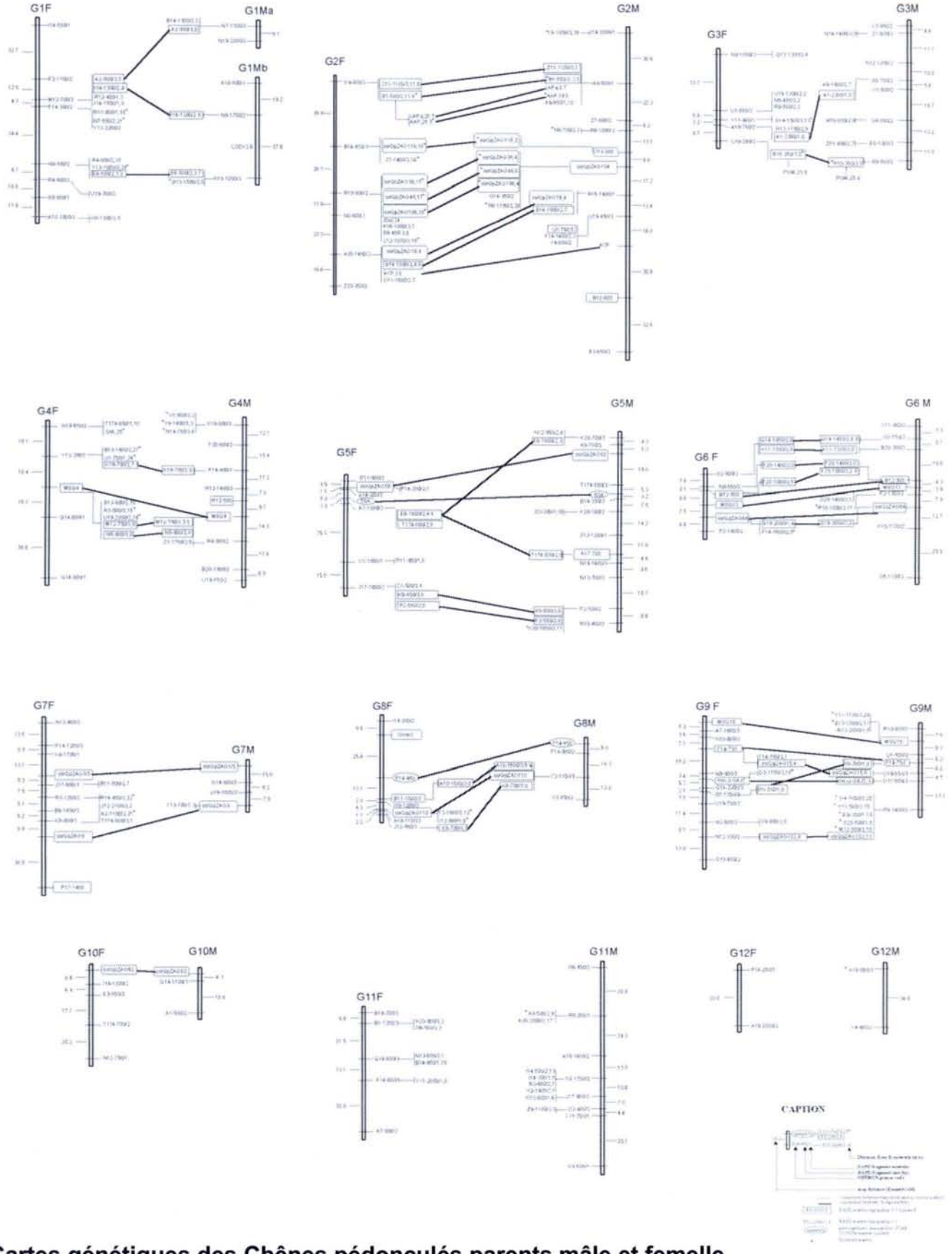
z = a.b - a'.b'

D'après Lichtenthaler (1987), les formules permettant de déterminer les concentrations en pigments sont alors :

Chl.a = ((b/z).A666 - (b'/z).A649)

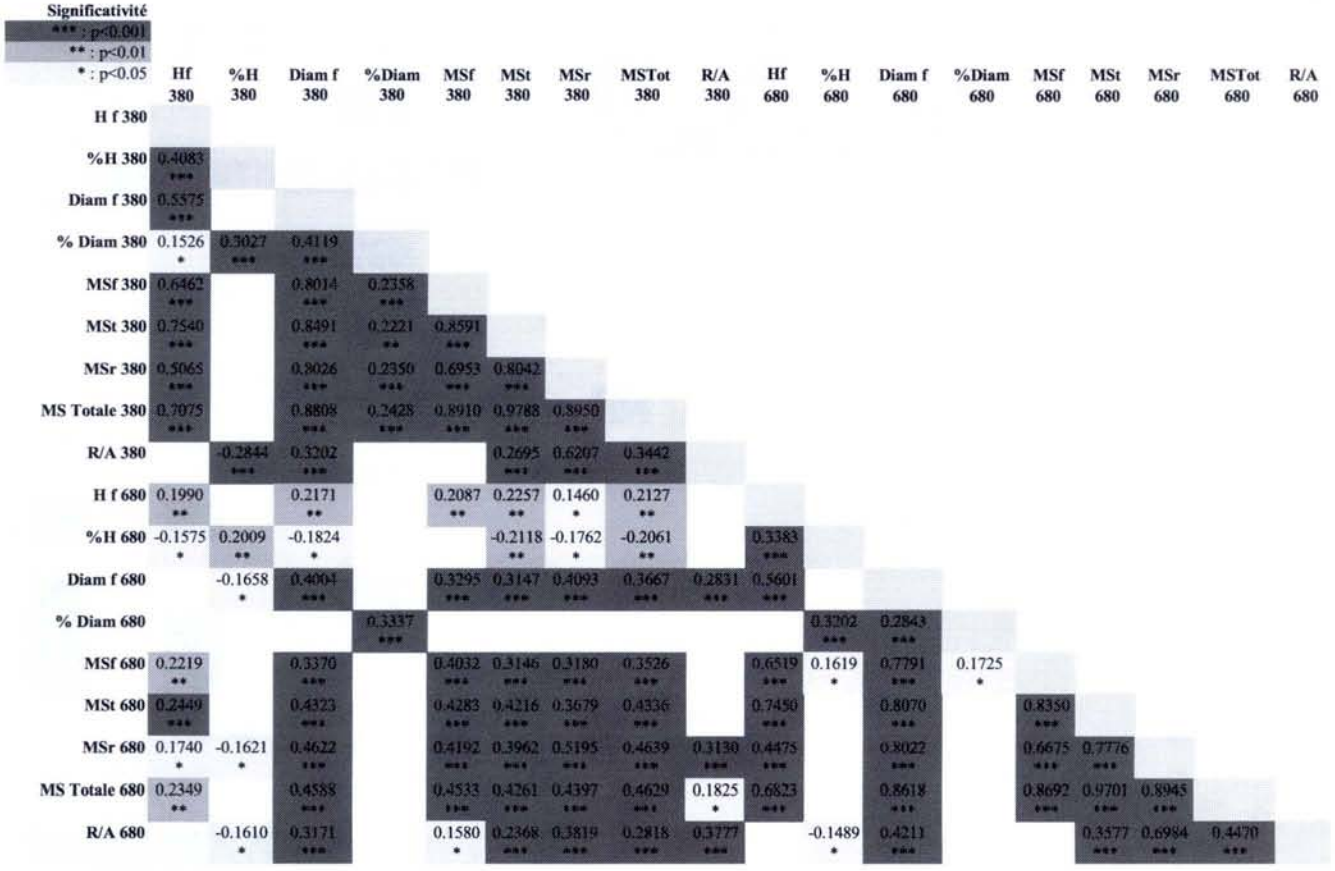
Chl.b = ((a/z).A649 - (a'/z).A666)

Carot. = (1000.A480 - a''.Ca - b''.Cb)/220



Cartes génétiques des Chênes pédonculés parents mâle et femelle de la famille de plein-frères étudiée

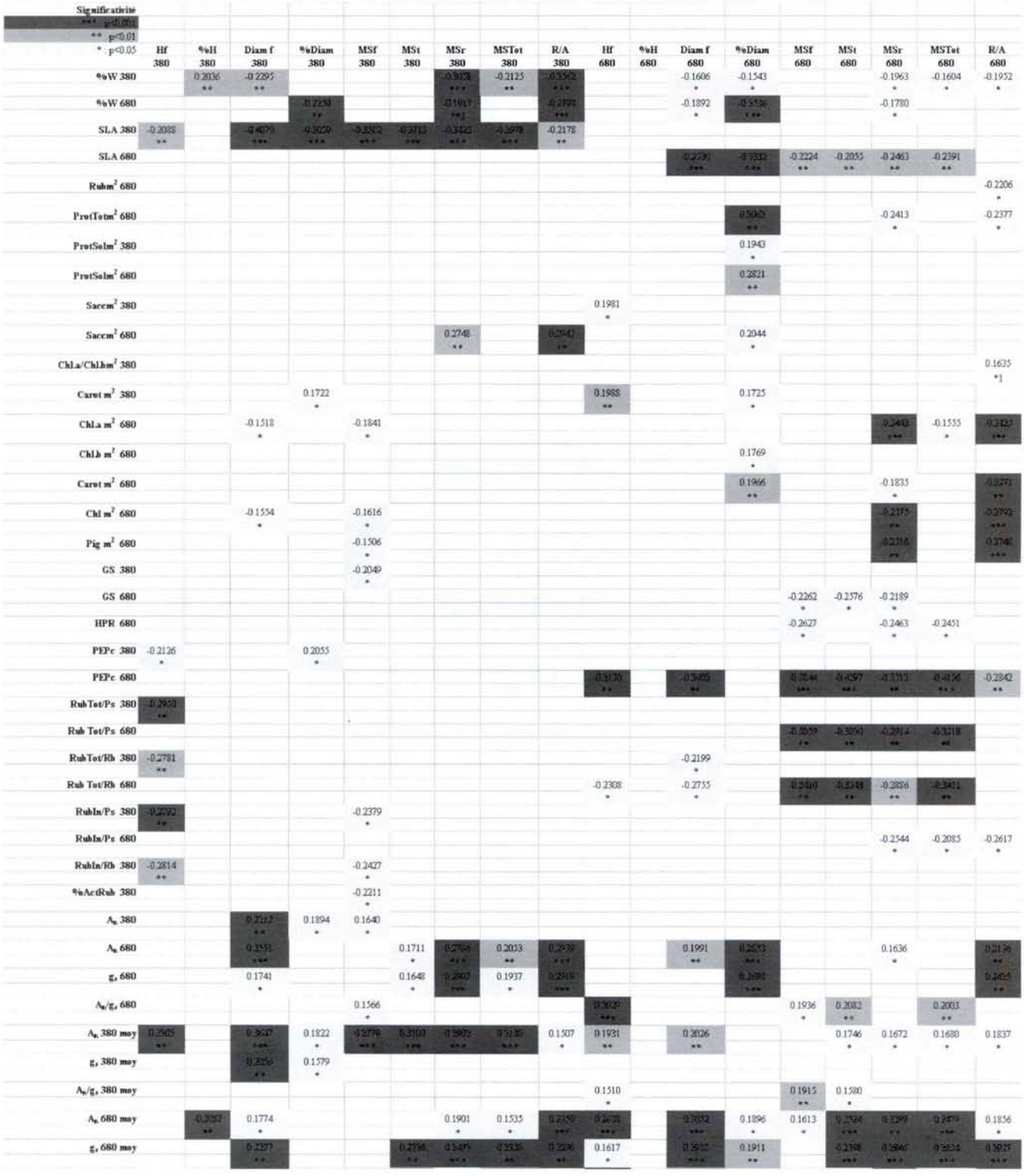
Disponibles sur le site http://www.pierroton.inra.fr/genetics/Quercus/



Significativité	Hf 380	%H 380	Diam f 380	%Diam 380	MSf 380	MSt 380	MSr 380	MSTot 380	R/A 380	Hf 680	%H 680	Diam f 680	%Diam 680	MSf 680	MSt 680	MSr 680	MSTot 680	R/A 680
H f 380																		
%H 380	0.4083 ***																	
Diam f 380	0.5575 ***																	
% Diam 380	0.1526 *	0.3027 ***	0.4119 ***															
MSf 380	0.6462 ***		0.8014 ***	0.2358 ***														
MSt 380	0.7540 ***		0.8491 ***	0.2221 **	0.8591 ***													
MSr 380	0.5065 ***		0.8026 ***	0.2350 ***	0.6953 ***	0.8042 ***												
MS Totale 380	0.7075 ***		0.8808 ***	0.2428 ***	0.8910 ***	0.9788 ***	0.8950 ***											
R/A 380		-0.2844 ***	0.3202 ***			0.2695 ***	0.6207 ***	0.3442 ***										
H f 680	0.1990 **		0.2171 **		0.2087 **	0.2257 **	0.1460 *	0.2127 **										
%H 680	-0.1575 *	0.2009 **	-0.1824 *			-0.2118 **	-0.1762 *	-0.2061 **		0.3383 ***								
Diam f 680		-0.1658 *	0.4004 ***		0.3295 ***	0.3147 ***	0.4093 ***	0.3667 ***	0.2831 ***	0.5601 ***								
% Diam 680				0.3337 ***							0.3202 ***	0.2843 ***						
MSf 680	0.2219 **		0.3370 ***		0.4032 ***	0.3146 ***	0.3180 ***	0.3526 ***		0.6519 ***	0.1619 *	0.7791 ***	0.1725 *					
MSt 680	0.2449 ***		0.4323 ***		0.4283 ***	0.4216 ***	0.3679 ***	0.4336 ***		0.7450 ***		0.8070 ***		0.8350 ***				
MSr 680	0.1740 *	-0.1621 *	0.4622 ***		0.4192 ***	0.3962 ***	0.5195 ***	0.4639 ***	0.3130 ***	0.4475 ***		0.8022 ***		0.6675 ***	0.7776 ***			
MS Totale 680	0.2349 **		0.4588 ***		0.4533 ***	0.4261 ***	0.4397 ***	0.4629 ***	0.1825 *	0.6823 ***		0.8618 ***		0.8692 ***	0.9701 ***	0.8945 ***		
R/A 680		-0.1610 *	0.3171 ***		0.1580 *	0.2368 ***	0.3819 ***	0.2818 ***	0.3777 ***		-0.1489 *	0.4211 ***			0.3577 ***	0.6984 ***	0.4470 ***	

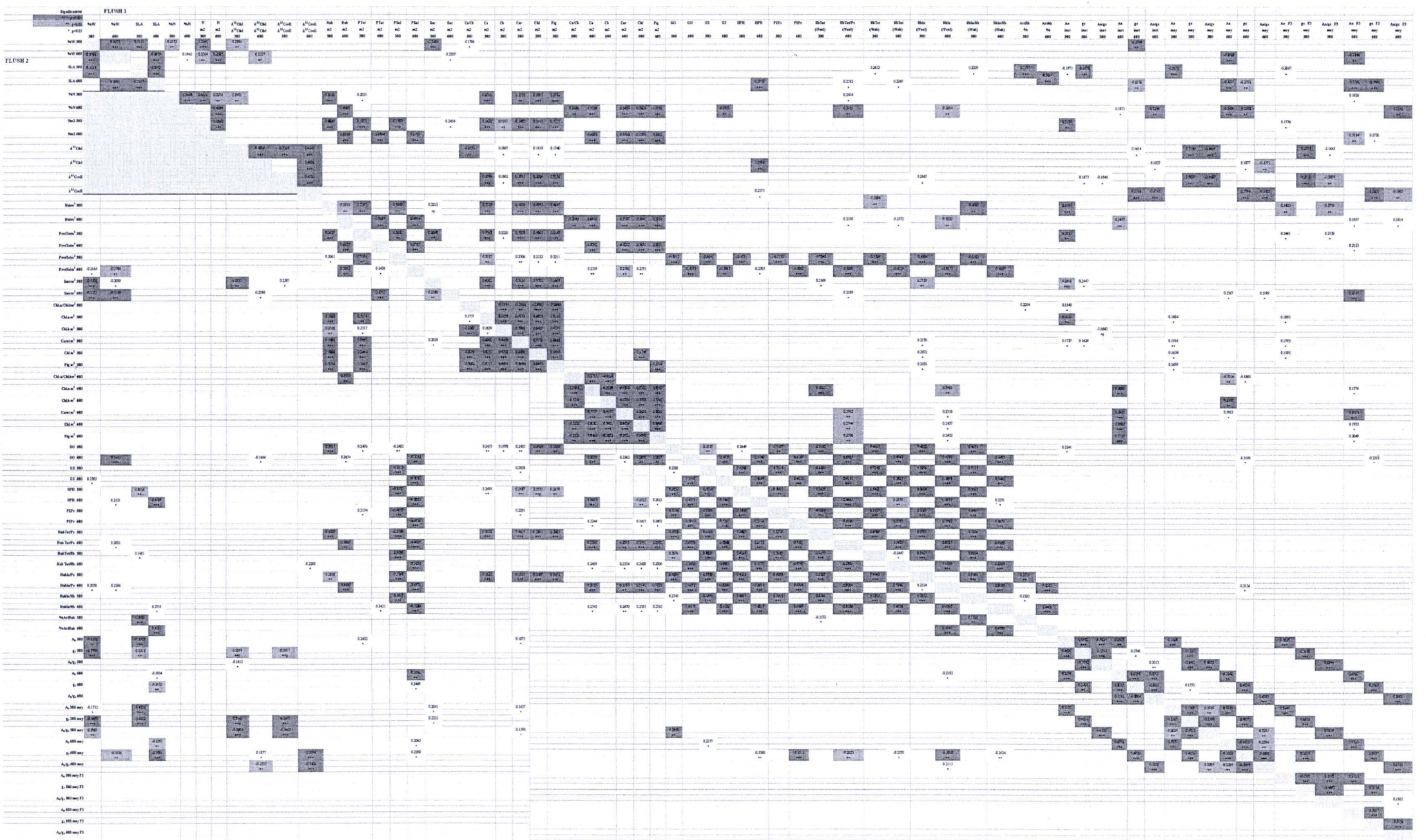
Corrélations entre paramètres de croissance en hauteur et biomasse des chênes soumis à 380 et 680 vpm [CO_2].

Hf = Hauteur finale (t5) ; **%H** = croissance hauteur sur la saison ; **Diam f** = Diamètre final du tronc (t5); **%Diam** = croissance en diamètre sur la saison; **MSf,t,r;tot** = Masse Sèche des feuilles, tiges, racines, totale; **R/A** = rapport biomasse racinaire / biomasse aérienne.


Significativite
***: p<0.001
**: p<0.01
*: p<0.05
Hf 380
%H 380
Diam f 380
%Diam 380
MSf 380
MSt 380
MSr 380
MSTot 380
R/A 380
Hf 680
%H 680
Diam f 680
%Diam 680
MSf 680
MSt 680
MSr 680
MSTot 680
R/A 680
%W 380
%W 680
SLA 380
SLA 680
Rubm² 680
ProtTotm² 680
ProtSolm² 380
ProtSolm² 680
Saccm² 380
Saccm² 680
Chl.a/Chl.bm² 380
Caret m² 380
Chl.a m² 680
Chl.b m² 680
Caret m² 680
Chl m² 680
Pig m² 680
GS 380
GS 680
HPR 680
PEPc 380
PEPc 680
RubTot/Ps 380
Rub Tot/Ps 680
RubTot/Rb 380
Rub Tot/Rb 680
RubIn/Ps 380
RubIn/Ps 680
RubIn/Rb 380
%AccRub 380
Ag 380
Ag 680
gs 680
Ag/gs 680
Ag 380 moy
gs 380 moy
Ag/gs 380 moy
Ag 680 moy
gs 680 moy

Significativité																		
*** : p≤0.001																		
** : p≤0.01	Hf	%H	Diam f	% Diam	MSf	MSt	MSr	MS Totale	R/A	Hf	%H	Diam f	% Diam	MSf	MSt	MSr	MS Totale	R/A
* : p≤0.05	380	380	380	380	380	380	380	380	380	680	680	680	680	680	680	680	680	680
%W 380	-0.1504 *		-0.2130 **		-0.1946 **	-0.2448 ***	-0.2944 ***	-0.2670 ***	-0.2937 ***									
%W 680	-0.1532 *									-0.1693 *		-0.2339 **		-0.1939 **	-0.2179 **	-0.2113 **	-0.2277 **	
%N 380	-0.2732 ***		-0.3167 ***		-0.3561 ***	-0.3696 ***	-0.3979 ***	-0.4004 ***	-0.1897 *									
%N 680										-0.3136 ***		-0.3412 ***	-0.2093 **	-0.4303 ***	-0.4159 ***	-0.3789 ***	-0.4146 ***	
Nm² 380							-0.2091 **											
Nm² 680														-0.1725 *				
Δ^{13}Cfol 380	-0.2171 **				-0.2326 **	-0.2066 **		-0.1969 **										
Δ^{13}Ccell 380						-0.1545 *												
Rubm² 680											-0.2784 **		0.3110 ***					
Chl.a/Chl.bm² 380									0.2213 **									
Chl.a m² 380					-0.1652 *													
Chl.b m² 380					-0.1494 *													
Chl.a m² 680														-0.2090 **		-0.1603 *	-0.1712 *	
Caret m² 680														-0.1658 *				
Chl m² 680		#### *												-0.2104 **				-0.1611 *
Pig m² 680														-0.2018 **				
GS 380		#### *																
GO 680													-0.2301 *					
Rub Tot/Ps 680													-0.2498 *					
Rub Tot/Rb 680	0.2591 *																	
A_n 680	0.2305 **									0.3187 **		0.2973 ***		0.2363 **	0.2939 ***	0.3634 ***	0.3572 ***	0.1630 *
g_s 680																		
A_n/g_s 680										-0.1670 *		-0.2147 **		-0.1623 *	-0.2061 **	-0.2029 **	-0.2143 **	
A_n 380 moy			0.3640 ***	0.1822 *	0.2779 ***	0.3100 ***	0.2902 ***	0.3189 ***	0.1507 *									
g_s 380 moy			0.2056 **	0.1579 *														
A_n/g_s 380 moy	0.1677 *																	
A_n 680 moy										0.2620 ***		0.3052 ***	0.1896 *	0.1613 *	0.2524 ***	0.2269 **	0.2479 ***	0.1856 *
g_s 680 moy										0.1617 *		0.2915 ***	0.1911 **		0.2598 ***	0.2546 ***	0.2624 ***	0.2027 ***
A_n 380 moy F3			0.2589 ***			0.2015 **	0.1844 *	0.2041 **										
g_s 380 moy F3			0.1967 **	0.1471 *			0.1455 *	0.1462 *										
A_n 680 moy F3										0.2356 **							0.1586 *	
g_s 680 moy F3										0.2719 ***		0.3251 ***	0.2063 **	0.2340 **	0.2807 ***	0.2932 ***	0.3204 ***	0.1967 **
A_n/g_s 680 moy F3												-0.3025 **	-0.2048 **		-0.1775 *	-0.2036 **	-0.1914 **	-0.1684 *

ANNEXE 8d



ANNEXE 9

Publication

QTL analysis of water use efficiency and growth in *Quercus robur* L. under elevated CO_2 concentration.

X.Torti, O.Brendel, C.Saintagne, A.Kremer, P.Dizengremel, J.-M.Guehl & D.Le Thiec

Soumise

Publication submitted

QTL analysis of water use efficiency and growth in *Quercus robur* L. under elevated CO_2 concentration.

Xavière Torti[1,2], Oliver Brendel[1], Caroline Saintagne[3], Antoine Kremer[3], Pierre Dizengremel[1,2], Jean Marc Guehl[1] and Didier Le Thiec[1]

[1]INRA-Centre de Recherches Forestières. UMR INRA–UHP Nancy 1 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, 54 280 Champenoux, France.

[2] UHP Nancy I, UMR INRA–UHP Nancy 1 Ecologie et Ecophysiologie Forestières BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[3] INRA, UMR Biogeco, Site de Recherches Forêt Bois de Pierroton, 69 route d'Arcachon, 33612 Cestas cedex, France

Author for correspondence:

Didier Le Thiec

Tel: +33 (0)3 83 39 40 98

Fax: +33 (0)3 83 39 40 69

Email: le_thiec@nancy.inra.fr

Summary

• The detection of QTLs implied in the regulation of growth and WUE was conducted on 183 genotypes of pedunculate oaks submitted to 380 or 680 vpm [CO_2].

• Trees grown under elevated [CO_2] showed no change in $\Delta^{13}C$, higher height (+25.5%), weigh (+45 %) and carbon assimilation (+36%), lower SLA (-12.4%) and stomatal conductance (-43.7%), and a markedly enhanced WUE calculated from gas exchanges (+60%) or discrimination (+80 %).

• 26 of the 55 detected QTLs and 19 of the 36 multi-environment QTLs were significant at the genome level ($p<0.05$) and distributed preferentially on linkage groups 2, 4, 8, 9, 11 and 12. The LG 11 showed in particular closed QTLs related to foliar water percentage, SLA, carbon discrimination and WUE all close, behind which could be a QTL for photosynthetic capacity. 7 Multi-Environment QTLs related to stem diameter, SLA, CO_2 assimilation and WUE showed significant responses to [CO_2] elevation.

• These results give one of the first published results at the day concerning specific QTLs of trees response to elevated [CO_2].

Key-Words: carbon isotope discrimination, elevated CO_2, gas exchanges, growth, pedunculate oak, QTLs, water use efficiency.

Abbreviations:

A_n	net CO_2 assimilation
Ci, Ca	internal and atmospheric CO_2 concentration for leaves
[CO_2]	CO_2 concentration on atmosphere
$\Delta^{13}C$	isotopic discrimination against ^{13}C
DW	Dry Weight
g_w	stomatal conductance to water vapour

LG	Linkage Group
LOD	Logarithm Odds
ME	Multi-Environment
ME-QTL	QTL detected using the Multi-Environment analysis
n	number of genotypes
p_{gen}	probability at the genome level
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density
QTL	Quantitative Trait Locus
RH	Relative Humidity
R/S	ratio Root biomass / Shoot biomass
r_S	Spearman's coefficient
SLA	Specific Leaf Area
WUEi	intrinsic Water Use Efficiency

Introduction

The striking elevation of CO_2 concentration ($[CO_2]$) on atmosphere and its relation with the global climate change is now evident (Ciais, 1999; Etheridge *et al.*, 1998), and several scenarios forecast that it could reach 550 to 1000 vpm at the end of the XXIth century (IPCC, 2001), associated with a warmer climate and fewer precipitations. Forest ecosystems –which represent more than 2/5 of Earth's surface (Melillo *et al.*, 1993) - are important carbon pools (Dixon *et al.*, 1994; Ciais, 1999) which could represent one possible solution to limit the elevation of $[CO_2]$ on atmosphere and its consequences on climate. In this way, variability in trees ability to accumulate more carbon during growth than the other functional groups (Ainsworth & Long, 2005) and to optimise their water-use efficiency (as the ratio between carbon assimilation to related water loss) will be an important clue for future forest management.

Numerous reviews (Curtis & Wang, 1998; Saxe *et al.*, 1998; Ceulemans *et al.*, 1999; Norby *et al.*, 1999; Woodward, 2002; Ainsworth & Long, 2005). summarise the data of experiments that were conducted the last decade in greenhouses, Open-Top Chambers, on natural CO_2 springs or more recently on Free - Air CO_2 Enrichment systems to estimate the effect of elevated $[CO_2]$ on forest trees A general conclusion is that all the observed responses are more or less species- and age- dependant, and are strongly correlated with environmental conditions (potted or free-rooted plants, nutrients and water availability, diseases or abiotic stress…) which makes it more difficult to extrapolate for predictive scenarios (Norby *et al.*, 1999). However, it is possible to bring out some conclusions and high $[CO_2]$ clearly alters the plant structure and ontogeny (Pritchard *et al.*, 1999). Experiments generally show a greater carbon uptake under elevated $[CO_2]$ characterised by a strong initial stimulation of trees biomass accumulation compare to trees at ambient $[CO_2]$ the first growth years and at a lower level by an enhancement of growth on height (Norby *et al.*, 1995; Gielen & Ceulemans, 2001).

This stimulated growth is generally associated with a greater production of leaves (Pritchard *et al.*, 1999; Polle *et al.,* 2001) with lower specific leaf area (SLA, $m^2.g^{-1}$) under elevated [CO_2] (Ainsworth & Long, 2005) which increases the total photosynthetic surface. Biomass repartition is more difficult to evaluate, but it seems that the ratio of root/shoot ratio is little or not affected by elevated [CO_2], and environmental conditions such as nutrient or water availability are the main factor introducing variation (Gielen and Ceulemans, 2001; Woodward, 2002).

Such enhanced growth under elevated [CO_2] is associated with increased water-use efficiency (WUE) by 50% or more compare to WUE observed in ambient [CO_2] (Ceulemans *et al.*, 1999; Wullschleger *et al.*, 2002; Ainsworth & Long, 2005). Intrinsic WUE can be estimated by two methods, instantaneous, using gas exchange and integrated, using stable carbon isotopes. Instantaneous intrinsic WUE can be calculated as the ratio of net carbon assimilation rate to stomatal conductance to water vapour. The modification of gas exchange in response to elevated [CO_2] is found to be one of the first response occurring in trees. Carbon assimilation shows the highest response, by increasing about 50% on a short-term experiment (Curtis & Wang, 1998; Medlyn *et al.*, 1999). For experiments longer than one year, this stimulation can disappear (Stitt, 1991; Vivin *et al.*, 1996) according to an acclimation process that could be related to source-sink relations (Arp, 1991; Woodward, 2002). The inability of sinks-organs to assimilate carbohydrates in great quantity could be due to species growth characteristics (Ceulemans *et al.*, 1999) or environmental constraints such as pot size or mineral availability (Badeck *et al.*, 1997; Ceulemans *et al.*, 1999). Indeed, in experiments conducted using FACE set-ups or with optimal fertility and irrigation conditions, this acclimation is lowered (Curtis *et al.*, 1995) or even non-existent (Gielen & Ceulemans, 2001; Eichelmann *et al.*, 2004). Conversely to assimilation enhancement, the exposition of trees to elevated [CO_2] has an opposite effect on stomatal conductance, which is not significantly modified (Norby *et al.*, 1999) or more often lowered (Woodward, 2002; Eichelmann *et al.*,

2004), but without a clear acclimation effect (Bettarini *et al.*, 1998; Medlyn *et al.*, 2001). Considering responses of carbon assimilation and stomatal conductance on a larger time scale, intrinsic WUE is often almost doubled by elevated [CO_2] (Tjoelker *et al.*, 1998; Gielen & Ceulemans, 2001, Ainsworth & Long, 2005). A second way to estimate intrinsic WUE is to measure the isotopic discrimination against ^{13}C on leaves or wood cellulose, which is inverse-proportional to WUE (Farquhar & Richards, 1984) and this method gives a time-integrated vision of WUE compared the previous method which is instantaneous. Studies that have been conducted on the response of isotopic discrimination against ^{13}C under high [CO_2] show contradictory results: elevated [CO_2] induces a decrease, or an elevation or no variation of plants discrimination (Beerling & Woodward, 1996; Miglietta *et al.*, 1998; Nguyen Tu *et al.*, 2004). As it is specified in several articles, species or variety specificity and/or environmental conditions and time-scale are probably the cause of such variation among results, and it can be explained by the fact that discrimination has in several experiments found to be correlated to stomatal conductance variations with environment. It seems to be controlled by a strong genetic determinism (Ehleringer & Cerling, 1995; Ponton *et al.*, 2001).

Much work has been done on the interspecific differences of acclimation to increased [CO_2]. The intraspecific variability is also interesting, as it is related to genetic determinism. Numerous studies has been conducted on crop plants to detect Quantitative Trait Loci (QTLs) in the last twenty years and in particular for growth, WUE and discrimination (for examples, see Brendel *et al.*, 2002). However the experiments on trees started quite recently, due to long generation time and thus the difficulty to produce of full-sib families. Only a small number of forest tree species was yet studied, such as multiple pines species (e.g. Lerceteau *et al.*, 2001; Brendel *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Devey *et al.*, 2004), eucalyptus and poplars species (Bradshaw & Grattapaglia, 1994; Thamarus *et al.*, 2004), willow (Tsahouras *et al.*, 2004), chestnut (Casasoli *et al.*, 2004), beech (Scalfi *et al.*, 2004) and oaks (Saintagne *et al.*, 2004; Scotti-Saintagne *et al.*, 2004). Majority of those articles deals with wood properties or

phenology, and at a lesser extent with growth, phenology or isotopic discrimination against ^{13}C (Brendel *et al.*, 2002; Casasoli *et al.*, 2004; Scalfi *et al.*, 2004; Scotti-Saintagne *et al.*, 2004; Tsahouras *et al.*, 2004). Even less experiments have been conducted to investigate QTLs for metabolism traits (Costa & Plomion, 1999) or QTLs of trees responses to environmental changes (Jermstad *et al.*, 2003).

In our experiment, we studied young seedlings of a pedunculate oak (*Quercus robur* L.) full-sib mapping family (Barreneche *et al.*, 1998). Our objectives were a) to evaluate the effect of elevated [CO_2] on the intra species variability in growth and leaf characteristics, gas exchange, isotopic discrimination against ^{13}C and Water Use Efficiency modification. b) to detect QTLs related to those quantitative traits and to study co-localisations and physiological relevance, and c) to detect QTLs related to the response of trees to elevated[CO_2], a subject that as far as we know has not yet been studied in trees species.

Materials and methods

Plant material

Trees used for the experiment came from a full-sib family of *Quercus robur* L. produced in 1992 at the Forestry Research Station of Pierroton, southwest of France. The F1-progeny was composed of 275 genotypes, which can be cloned used rooted-cuttings. A subset of 94 genotypes was used to construct a genetic map of both male and female parents of the full-sib family, using AFLP-markers, microsatellites and RAPD (Barreneche *et al.*, 1998) using pseudo-testcross mapping strategy.

Two sets of 183 genotypes were randomly within the family for this experiment. The three-years old trees were planted in pots of 10 litres filled with peat and sand (1:1) in February 2001 and each set was randomly distributed in two adjacent glasshouses (INRA Champenoux; 48°45'N, 6°20'E;259 m above sea level, France), with both clones of the same genotype having the same position in each glasshouse. Plants were continuously irrigated at field capacity and fertilised during the experiment (Nutricot 100 NPK + Mg). The pots were regularly moved to avoid a position effect on their development.

The physical parameters of both greenhouses were controlled, the temperature of each being based on the external temperature, except for temperatures under 10°C or over 40°C. In the first greenhouse, partial pressure of CO_2 was maintained over 380 vpm (ambient), whereas the partial pressure was elevated to 680 vpm in the second glasshouse by CO_2 injection.

The experiment started the day "t0" of fumigation start before bud burst (t0 = julian day 132) and five measurements campaigns were held until the end of the growing season (t1 to t5, respectively on julian days 149, 177, 204, 234 and 271). Environmental conditions and measurements description are summarised in Table 1.

Growth and biomass

Growth was estimated from measurements of stem height and base diameter measurements done at the beginning (t0) and at the end (t5) of the experiment.

Trees were cut at t5, and the different plant parts were collected and dried at 65 °C during 3 days for leaves and 5 days for roots and stems before being weighed.

Leaf gas exchanges

The net CO_2 assimilation rate: A_n (μmol m^{-2} s^{-1}) and stomatal conductance to water vapour: g_w (mol m^{-2} s^{-1}) were measured using two LiCor model 6200 (Lincoln, U.S.A.) portable photosynthesis chamber (4 l). Measurements were carried out five times between 08.30 and 11.00 GMT (on the first flush: t1 = julian day 149; on the second flush: t2 = julian day 177; on third flush: t3 = julian day 204, t4 = julian day 234, and t5 = julian day 271).

Microclimatic parameters in the gas exchange chambers were also recorded. Each measurement was made on one fully expanded sun leaf. From the gas exchange measurements the intrinsic water use efficiency (WUE) was calculated by dividing An by g_w.

The measurements were expressed according to the surface area of the measured leaves which was determined using a video camera coupled to an image analyser (Delta T, U.K.).

Foliar Surface and Water Percentage

Two samplings were made on fully expanded leaves of the second flush (t2, julian day 177) and the mature third flush (t5, julian day 271) immediately after gas exchange measurements. Three adjacent sun leaves were collected on two branches of each plant, in position 3, 4 and 5 starting from the top of the flush.

The fresh weight of the collected leaves and their surface were immediately measured (Image analyser Delta T, U.K.). Two half-leaves were dried at 60°C for two days to determine the corresponding dry matter and foliar water percentage. Specific Leaf Area (SLA, m^2 g^{-1} d wt) was estimated on the basis of the collected leaves.

Isotopic discrimination against ^{13}C on leaves and cellulose

The dry leaves of the third flush used for dry mass estimation (t5) were ground into a fine powder. 1 mg of powder was combusted and analysed to determine the carbon and nitrogen percentage on the leaf, and its $\delta^{13}C$ composition (Delta S Isotope Ratio Mass Spectrometer, Finnigan Mat, Germany).

In parallel, discrimination of cellulose was estimated, considering that cellulose gives a more integrative data for isotopic discrimination over the whole tree than leaves where carbon components are transients.

At the end of the experiment, 12 cm of branch were cut from the beginning of the second flush. Branches were frozen at -30°C, then bark was removed and they were cut into small pieces. The wood was dried for one week at 60°C, and finely ground using a ball mill (Sodemi) before extracting using a method adapted from Loader *et al.* (1997). 50 mg of dry powder were weighed into teflon filters (0.45 µm thickness) that were closed and put in soxhlet extractors. During the first step necessary to eliminate phenols and tannins, the bags were rinsed several times during 24 hours with a 2:1 (v/v) mix of hot toluene and ethanol. Then, bags were rinsed again with pure hot ethanol during 24 hours. Second step consisted in eliminating soluble sugars by rinsing the bags in bowling water for 3 hours. Last step was the lignin digestion using sodium chlorite. The bags were immersed into 700 ml of a solution containing 1 ml of cold acetic acid and 7 g of sodium chlorite ($NaHClO_2$), at 65°C. The bath was changed three times every thirty minutes, and bags were let in the last bath for 3 hours. Then, samples were rinsed and partially dried for one hour at 45°C. Cellulose was recovered, dried and finely ground in stainless steel bowls. $\Delta^{13}C$ was measured for the cellulose powder as described for leaf material.

Isotopic composition of the atmospheric [CO_2] was determined in each glasshouse using maize plants, according to the relation described in Picon *et al.* (1996a).

Isotopic discrimination data were related to $[CO_2]$ by the relation (Farqhuar *et al.*, 1982):

$$\Delta = a + (b - a)\, Ci / Ca \quad (1)$$

and it can also be used to calculate intrinsic WUE according to the equation (Farquhar and Richards, 1984):

$$WUEi = Ca/1.6\, \upsilon * (b - \Delta) / (b - a) \quad (2)$$

where Ci and Ca are the internal and atmospheric CO_2 concentrations for the leaf, a and b are the discrimination coefficients against ^{13}C respectively for stomatal conductance and carboxylation stages (standard values: a = 4.4 ‰; b = 27 ‰; Farquhar *et al.*, 1989), υ is the difference of vapour pressure between air and the leaf, and Δ is the isotopic discrimination against ^{13}C measured on leaf or wood cellulose. This method gives a time-integrated vision of WUE in comparison to WUE derived from gas exchanges data which are instantaneous values.

Statistical analysis

Statistical analysis were done using the Statistica 6.1© (StatSoft, Paris, France) software. Before any further analysis normality was tested of all data sets using Shapiro-Wilk's test and, as appropriate, data was log transformed.

Significance of the responses to elevated $[CO_2]$ or among flushes was tested using both simple ANOVA and t-test for dependent samples ($p < 0.05$ and $p < 0.01$).

Pearson's correlation coefficient was determined for each pair of traits, considered as significant at $p < 0.05$.

Results for gas exchanges were evaluated also by non linear correlation (Spearman's coefficient) in order to do a rank test for each date of measurements.

QTLs analysis

All quantitative data were analysed using the MultiQTL 2.4 software (MultiQTL ltd., Institute of Evolution, Haifa University, Israel; http://esti.haifa.ac.il/~poptheor), for male and female genetic maps of the pedunculate oak family (Barreneche *et al.*, 1998).

First, putative QTLs with LOD (Logarithm Odds) scores above 2 were determined using Interval Mapping on linkage groups (Lander & Botstein, 1989). This analysis was conducted using both single and two-linked QTLs (per linkage group) models. No LOD normalisation nor missing data restoration options of MultiQTL were used.

Only for traits where putative QTL were detected, Multiple Interval Mapping (MIM) was used, which takes into account the effects of the already detected QTL to detect further QTL in an iterative process (Jansen & Stam, 1994; Zeng, 1994). For the experiment, the detection was based on 1000 data permutation, with a significance level of p=0.05.

Standard deviation of each estimated QTL location was calculated using a bootstrap test (described by Visscher *et al.*, 1996) on 1000 permutations of the data. QTLs with no clear effect on quantitative response of a trait (i.e. different from zero, using a 95% confidence interval) were considered as non-valid and thus excluded from the presented results.

Significance of putative QTL was recalculated at the genome level (p_{gen}) using the equation, described by Saintagne *et al.* (2004), which gives p_{gen} as a function of p_{CIM} :

$$p_{gen} = 1 - (1-p_{CIM})^{(M/m)} \qquad (3)$$

where M is the total number of markers on the genome used for QTL detection, and m the number of markers of the linkage group where the QTL was detected. QTLs with $p_{gen} < 0.05$ were considered as significant QTLs. Results on putative QTL are only presented if colocalizing within ±1 interval with a significant QTL.

MultiEnvironment analysis (Jansen *et al.*, 1995) was carried on both [CO_2] environments to increase detection power of low effect QTL. The difference of the QTL's effect between ambient and elevated [CO_2] was tested using a submodel equalising the effects. The significance of this submodel was well as the difference between the submodel and the initial model were tested using permutation of data (N=1000).

Results

Climatic conditions

No significant differences were observed for climatic conditions during the experiment between glasshouses, except for relative humidity which was lower in the elevated [CO_2] glasshouse for the three first measurement days.

Growth and biomass

Stem height and diameter at the collar level were significantly higher (respectively +25.5% and +10%) for trees grown under 680 vpm [CO_2] at the end of the growing season. Growth of the different parts of the trees were significantly stimulated under elevated [CO_2] (Table 2), showing 35.9 %, 45.1 %, and 52.9 % higher mass respectively for the leaves, stems and roots dry mass. The total biomass was 45% higher in average for trees grown under 680 vpm [CO_2] relative to the trees grown under 380 vpm [CO_2]. Root growth was more stimulated than the above-ground parts of the trees. The ratio between roots and shoots was significantly higher by 5.5% under elevated [CO_2], but the increase of 4.6% for the ratio roots / total biomass was significant between both treatments [CO_2].

Leaf Characteristics (Water Percentage, SLA)

The percentage of water in leaves (Table 2) seemed to be unchanged between flushes and CO_2 treatments, except a slight but significantly lower (- 3.5 %) water percentage for the second flush leaves (t2) under high [CO_2].

No significant effect of elevated [CO_2] on the average individual foliar area was detected, but area was significantly smaller for leaves of the third flush compared to those of the second one.

SLA was significantly lower under elevated [CO_2] relative to ambient [CO_2] for the second flush (-12.4 %) but not for the third flush (-4.2 %). A significant lower SLA was found for second compared to third flushes at ambient [CO_2] (-4.9 %), but no for trees grown under elevated [CO_2] (-4 %).

Leaf gas exchanges

Average net CO_2 assimilation rate (A_n, Fig. 1a) was increased since the beginning of the experiment for trees grown under elevated [CO_2], with significantly higher values for the first flush (+18.2%) and the second flush (+36%). However, differences between treatments were much more reduced for the third flush, with a significant higher assimilation only at t4 (+12.7% for trees grown under 680 vpm [CO_2]). Although the difference was not statistically significant, a trend to lower An (-10%) was observed for trees grown under elevated [CO_2] compared to ambient [CO_2] at the end of the growing season (t5).

Family mean stomatal conductance to water vapour (g_w, Fig. 1b) was not affected by high carbon dioxide concentration during the first flush, but was found to be significantly lower for trees grown under elevated [CO_2] from the second flush (t2: -21.5 %), with maximal difference at the beginning of the third flush (t3: -43.7 %) then a progressive reduction of differences between treatments until the end of experiment (t4: -39.1 %; t5: -32.1 %).

Based on these observations, the ratio An/g_w (Fig. 1c) was strongly modified by environmental [CO_2] (+ 59.5% in average on the growing season under elevated [CO_2] relative to ambient [CO_2]). Trees grown under elevated [CO_2] showed higher An/g_w ratios than trees under ambient [CO_2] (from + 15.4% to + 99.3%), with the lowest difference between treatments for the first flush, the highest value for the first measurement on the third flush, and a lesser difference of +49.1% at the end of the growing season.

Distribution of genotypes for gas exchange variables at the five growing steps are represented Figure 2. For net carbon assimilation, frequencies showed more trees presenting

higher A_n for 680 vpm [CO_2] for the two first flushes. Difference between treatments presented similar distribution for the third flush, with only a slight reduction of the scale of values obtained at 680 vpm for the last measurement.

From the second flush onwards, the distribution of values of stomatal conductance within the family changed between the treatments: under ambient [CO_2], stomatal conductance increased with time, whereas there was no such evolution under elevated [CO_2], where conductance stayed low. Distribution of genotypes according to their WUE - calculated as the An/g_w ratio - showed differences between [CO_2] treatments, with a shift (Figure 2) of the distribution to lower values under ambient [CO_2] and under elevated [CO_2] towards higher WUE (except for the last day of measurement) and a larger range of values.

Clonal ranking between both treatments was conserved for all dates for A_n and to a lesser extent also for g_w and WUEi (non-linear correlations using Spearman's coefficient, r_s; Table 4).

Isotopic discrimination against $^{13}CO_2$ ($\Delta^{13}C$)

Elevated [CO_2] involved no significant changes on measured isotopic discrimination against ^{13}C, which was found to be higher in leaves (18.83 ‰ in average) than in wood cellulose (17.25 ‰ in average), both harvested at the end of the experiment.

Comparison between discrimination values obtained at 380 or 680 vpm [CO_2] also showed similar linear correlation between treatments (Fig. 3a,b), with r^2 of 0.24 and 0.44 respectively for leaves and cellulose.). Correlation of discrimination between measurements on wood cellulose and leaves (Fig. 3b) were significant at ambient as well as at elevated [CO_2]. For both levels of [CO_2] the correlation slopes were similar and parallel to the 1:1 line, showing a constant higher discrimination in leaves compared to the wood cellulose, undisturbed by the CO2 concentration.

Calculated WUEi from discrimination values were significantly higher (about 80%) for trees grown under elevated [CO_2] (WUE_{foliar} = 153.49 ± 1.83; WUE_{cell} = 182.16 ± 2.54)

compared to ambient [CO_2] (WUE_{foliar} = 84.85 ± 0.79; WUE_{cell} = 101.65 ± 0.87) and higher for cellulose derived data than foliar one.

The foliar $\Delta^{13}C$ was significantly and positively correlated with the foliar water percentage (r^2 = 4.8 % for both treatments) and with SLA (r^2 = 10.2 % and 6.8 % respectively at 380 vpm [CO_2]), but the correlations were not significant for cellulose $\Delta^{13}C$ (Table 5). No significant correlation was found between discrimination and net carbon assimilation. However correlation between cellulose $\Delta^{13}C$ and the average conductance was significant for both [CO_2] treatments, but the correlation coefficient was lower under elevated [CO_2] (r^2 = 8.4 %) that under ambient [CO_2] (r^2 = 13.7%) and also lower with third flush average conductance than with the average calculated on the five measurements (average conductance; Table 5). Foliar $\Delta^{13}C$ was correlated with average conductance (r^2 = 10.2 %) only for trees grown under ambient [CO_2]. Discrimination was negatively correlated with the average An/g_w ratio (r^2 = 5.8 to 7.3 %), but the correlation was not significant with the third flush average.

Detected QTLs

55 QTLs were found (Table 6;) for growth, foliar characteristics, WUE, gas exchange and $\Delta^{13}C$, 26 of them being significant at the genome level ($p < 5\%$) . 34 QTLs were detected using the MultiEnvironment test (Table 7), 19 of which were significant at the genome level(Figure 4).

Five QTL were detected for the final total, root and stem Dry Weight measured at 380 vpm [CO_2] on LG 11 and LG 12 of the male map, where QLT for total, root and stem dry weight colocalised on LG11. Only one QTL for Roots DW on LG 11 explaining 7.8% of the phenotypic variability was significant and colocalised with two putative QTL for total and stem DW, whereas the last two putative QTLs for total and stem DW were colocalised on the LG 12. No QTL was detected for Leaves Dry Mass or for 680 vpm [CO_2] data. The Multi-Environment (ME) test gave two significant QTLs for total DW on LG 2 and 12 of male map,

and PEV of the last one was strongly reduced under elevated [CO_2] (PEV = 13% and 4.9% respectively under ambient and elevated [CO_2]). Two putative ME-QTLs for stem DW on LG 12 of female map and LG 2 of male map. None of them revealed a genetic response to elevated [CO_2]. No ME-QTL was found for root DW.

3 QTLs were detected for initial and final stem diameter measured at 380 vpm [CO_2] on LG 11 and LG 12 of the male map. Only one QTL on LG12 related to the final diameter was significant and explained 13.4 % of the phenotypic variance of the trait and colocalised with the putative QTL for the initial diameter. It was also detected using the ME test and responded significantly to elevated [CO_2], with a reduction of the effect of the QTL on phenotype at high [CO_2]. Two significant QTLs were detected on female map for initial stem height on LG 12 for 380 vpm [CO_2] and LG 4 for 680 vpm [CO_2], each explaining around 10% of the phenotypic variance. Similar ME-QTLs were founded at the same locations, but were not significant.

3 significant QTLs were detected for foliar water content measured at different times and [CO_2] treatments, on LG 11 of female map (680 vpm-t5), and on LG 9 (380 vpm-t5) and 11 (680 vpm – t2) of the male map. One putative QTL was also detected on LG 2 of the male map. No ME-QTLs were detected for water content. 4 significant QTLs were detected for SLA, on LG 2 of female map (380 vpm – t5), on LG 8 and 11 of the male map (380 vpm –t2), representing 21.1 % of the phenotypic variance, and one on the LG 11 of the male map, at a different locus than the previous QTL, related to 680 vpm – t2 data. One putative QTL for SLA measured at 680 vpm – t5 was also found on LG 3 of the male map. Only 3 QTLs were detected for SLA using the ME analysis. Two of them were significant and located on LG 11 (for t2 data) and LG 3 (for t5 data) of the male map. This last QTL presented a stronger negative effect on SLA and explained more of the phenotypic variance under elevated [CO_2] compared to ambient [CO_2]. The putative ME-QTL was localised on LG 2 of the female map.

5 QTLs were detected for foliar $\Delta^{13}C$, the 4 significant QTLs being all localised on the male map. Analysis of the 680 vpm data gave one QTL on each LG 2,8 and 11, for a total PEV of

28.8 %, whereas only one significant QTL was detected for 380 vpm data on LG 11, and one putative QTL on LG 2. 3 significant ME QTLs were detected on LG 2, 8 and 11 of male map (same locations than the simple QTLs), explaining 28.7 and 33 % of the phenotypic variance respectively at 380 and 680 vpm [CO_2], but didn't reveal any specific response to [CO_2] elevation.

5 QTLs were detected for cellulose $\Delta^{13}C$. One significant QTL was localised for the 380 vpm data on LG 4 of the female map, explaining 14.1 % of the phenotypic variance. Two additional putative QTLs were detected on LG 2 and 9 of the female map for this environment. 2 significant QTLs were found to co-localise on LG 11 of the male map with a doubled PEV for the 380 vpm data (24.1%) compared to 680 vpm data (12%). All the detected QTLs were confirmed using the ME analysis and were significant, except the QTL localised on LG 2 of female map which kept putative. No significant QTL related to a [CO_2] effect was detected.

Among the 9 detected QTLs for net CO_2 assimilation, only two related to t3 measurements were significant and were located on LG 6 and 9 of the male map. The first QTL was detected for the trees under elevated [CO_2] on LG 6 and explained 10% of the phenotypic variance. The second QTL was detected on the top of the LG 9 for the 380 vpm [CO_2] data and explained 13.3% of the total variation. ME analysis revealed the presence of 2 QTLs, one QTL significant on LG 9 of the male map, which responded significantly to [CO_2] (characterised by opposite effects under ambient compared to elevated [CO_2] on cellulose $\Delta^{13}C$), and one putative QTL on LG 12 of the male map.

Stomatal conductance to water vapour showed the largest number of detected QTLs for gas exchanges at the five dates (11 QTLs, of which 5 were significant, spread over the two maps). 3 significant QTLs were detected on female map, all linked to measurements realised under 380 vpm [CO_2]. One QTL was obtained for the first flush (t1) on LG 5 and explained 8.3% of the phenotypic variance, and two-linked QTLs were detected for the second flush (t2) on LG 3 and explained 27 % of the observed variance. For the male map, one significant QTL

was detected for stomatal conductance measured at 680 vpm [CO_2] at t4 on LG 8, and explains 12.6 % of the phenotypic variance. Another significant QTL was detected on LG 10 for the average conductance measured during the third flush under ambient [CO_2] and explained 12.2 % of the total variance. 6 additional putative QTLs were detected on LG 11 and 12of the female map, and LG 6, 8 and 10 of the male map. One putative ME-QTL was localised on LG 11 of the female map although it showed a significant response to elevated [CO_2]. For the male map, four ME-QTLs related to t4 measurements and average conductance on flush 3 were detected on LG 8 and 10. Only the QTL related to flush 3 on LG 8 was significant and showed a strong enhancement of the QTL effect on conductance under elevated [CO_2], but was not found to be related to the trees response to [CO_2] elevation.

Only one significant QTL was detected for WUE calculated from gas exchanges data on LG 10 of the female map, corresponding to data obtained on flush 1 (t1) at ambient [CO_2], and explaining 8.3% of the phenotypic variance. 5 more putative QTLs were localised on LG 11 of the female map, and LG 6, 8, 10 and 11 of the male map. One putative ME-QTL was found from t3 data on LG 9 of the female map.

Concerning WUE data calculated from discrimination values, 3 significant ME-QTLs were detected for WUE issued from leaves, on LG 9 of the female map and LG 8 and 11 of the male map. These two last QTLs had opposite effects on WUE that were reinforced under elevated [CO_2] for a similar PEV (about 20.8 and 21.2 % under ambient or high [CO_2]). Furthermore, the QTL on LG 8 was found to be significantly linked to the elevation of [CO_2] with a higher positive effect of the QTL on WUE under high [CO_2]. For WUE issued from cellulose discrimination, 5 ME-QTLs were detected on LG 2, 9 and 11 of the female map and on LG 4 and 11 of the male map. The QTL on LG 9 of the female map was significant and revealed a significant response to [CO_2] elevation (the negative effect of the QTL was about 5-time higher under elevated [CO_2] than under ambient [CO_2]). On male map, both QTLs were significant, but only the QTL on LG 8 was detected to be related to [CO_2] elevation with no

significant modification of the PEV, whereas the QTL on LG 11 showed much lower PEV under elevated [CO_2] (3.1 %) than under ambient [CO_2] (21.5 %) but without significant modification of the effects to [CO_2] elevation.

Discussion

Plant growth and leaf characteristic responses to elevated [CO_2]

Growth in diameter and height of shoots has been significantly stimulated (+10 and 25.6% respectively) under elevated [CO_2], which corresponds to the common early growth enhancement observed in oaks species (Norby *et al.*, 1995; Picon *et al.*, 1996a; Anderson & Tomlinson, 1998). However, the most evident response to [CO_2] elevation was the enhancement of total biomass production (+ 45 %) under high [CO_2], which is consistent with observations made on several deciduous tree species (Badeck *et al.*, 1997; Picon *et al.*, 1997; Gielen & Ceulemans, 2001; Maroco *et al.*, 2002). Such growth enhancement is probably the consequence of a stimulation of assimilation rate detected in this study as well as of carbon sink activities under elevated [CO_2] (Farrar and Williams, 1991) that Mousseau & Saugier (1992) related to the high-growing potential of trees.

Leaf total biomass production was also stimulated under 680 vpm [CO_2] compared to ambient [CO_2], which can be due to a higher number of produced leaves. Another reason could be that elevated [CO_2] affected leaf surface, mass or thickness (Liu *et al.*, 2002; Tricker *et al.*, 2004). We indeed found a decrease (-12.4%) of SLA of the second flush leaves under elevated [CO_2] compared to ambient [CO_2] which was consistent with conducted experiments on other tree species (Pettersson & McDonald., 1992; Guehl *et al.*, 1994; Jach & Ceulemans, 1997) but different from other experiments on pedunculate oak which revealed no variation of SLA (Picon *et al.*, 1996a; Picon *et al.*, 1997) or a higher decrease (Vivin *et al.*, 1996; Maillard *et al.*, 2001). Here, the average leaf area component of SLA was not modified under elevated CO_2 concentration as for holm-oak (Tognetti & Johnson, 1999) at the contrary of the stimulation observed on several other experiments (Badeck *et al.*, 1997; Ceulemans *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2003). Our results thus indicate an increase of leaves individual mass under high [CO_2]

compared to ambient one in the second flush. Several causes can be evoked as the increase of leaf parenchyma's thickness (Oksanen *et al.*, 2001; Tricker *et al.*, 2004) and/or the elevation of leaf density for example following accumulation of starch in cells (Radoglou & Jarvis, 1990; Tjoelker *et al.*, 1998; Oksanen *et al.*, 2001). Finally, the fact that SLA was not significantly modified by high [CO_2] in the third flush conversely to observations made on pedunculate oak by Vivin *et al.* (1996) and Maillard *et al.* (2001) could reveal an early acclimation of the leaf physiology to elevated [CO_2].

Root biomass production was enhanced by the elevation of [CO_2], and this could be related to the stimulation of fine root production, elongation and turn-over than can induce an elevation of carbohydrate fluxes directed to below-ground growth (Pregitzer *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 2004). However, root biomass has been more stimulated than shoot biomass production, which has been attributed to nitrogen or nutrient deficiency (Gorissen *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 2003). Root to Shoot ratio (R/S) was indeed often lowered under elevated [CO_2] as for some oak species (Norby *et al.*, 1995; Picon *et al.*, 1996a; Vivin *et al.*, 1996) or otherwise no significant modification was detected under non-limiting growth conditions (Picon *et al.*, 1997; Maillard *et al*, 2001; Marocco *et al.*, 2002; Woodward, 2002). Considering that root biomass represented about 25% of the total biomass which was less than the percentage measured on pedunculate oak seedlings (Picon *et al.*, 1996a), we can wonder if this growth response to high [CO_2] is simply related to a specificity of the used genotypes or if it was a consequence of the cloning method or their growth conditions in small pots before the experiment, which could have limited the root production until the transplantation in glasshouses.

Leaf gas exchange

A stimulation of net CO_2 assimilation rate of trees under elevated [CO_2] was observed on the first measurement (t1, Table 1a). A similar trend can be seen in the results of Picon *et al.* (1997) on pedunculate oak, although assimilation values were higher than our and presented larger differences between CO_2 treatments. This suggests that assimilation presents one of the earlier responses of trees physiology to [CO_2], as in the same time, no significant modification of stomatal conductance was observed (Table 1b).

The positive effect of high [CO_2] on carbon assimilation was accentuated on the second flush (t2), the net carbon assimilation under elevated [CO_2] reaching more than 30% of its value under ambient [CO_2]. The stimulation of assimilation rate can be related to two principal causes that would require complementary analysis to our experiment to precise the response mechanism. The first one is the modification of the carbon assimilation metabolism – and more specifically rubisco activity and quantity, electron transport and sugars turn-over (Eichelmann *et al.*, 2004). The second is the reduction of carbon loss by respiration and photorespiration under elevated [CO_2] (Booker *et al.*, 1997; Gonzalez-Meler *et al.*, 2004).

The stimulation effect observed for assimilation rate for the second flush was progressively lower for the third flush, suggesting an acclimation effect related to several factors influencing source-sink relations (Rey & Jarvis, 1997). A first factor is the sink strength, i.e. the ability of the sinks to store produced sugars and to avoid a sugars overloading of the leaves. However, if starch or sucrose concentrations do not seem to be major regulatory factors for photosynthesis (Picon *et al.*, 1997; Ludewig *et al.*, 1998; Sholtis *et al.*, 2004), it is known that regulation by the end-products of photosynthesis and Pi-regeneration capacity is a more determining factor for assimilation regulation (Paul & Pellny, 2003). Another acclimation factor is the photosynthetic capacity that must be able to respond to the sink demand. Nitrogen foliar concentration, related to rubisco concentration (Bowes, 1991), gives a first estimation of

this capacity, and some experiments had related the acclimation effect to a depletion in foliar nitrogen under elevated [CO_2] (Ceulemans & Mousseau, 1994; Lewis *et al.*, 2004), which was observed in our experiment (data not shown).

Stomatal conductance was found to be significantly reduced in our experiment for trees grown under high [CO_2] from the second flush. This trend has been observed in different time-scale studies (Beerling, 1996; Picon *et al.*, 1997; Bettarini *et al.*, 1998; Medlyn *et al.*, 2001). The 20 to 40% decrease of stomatal conductance for the second and third flush in our experiment is consistent with responses of some tree species (Medlyn *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Herrick *et al.*, 2004). However, others experiments on trees (Gunderson *et al.*, 1993; Curtis & Wang, 1998; Greenep *et al.*, 2003) did not show significant modification of stomatal conductance by [CO_2] concentration, even for some experiments on pedunculate oak (Bunce, 1992; Picon *et al.*, 1996b). Thus, at the contrary of acclimation effect noted for carbon assimilation, data of long-term experiments showed on multiple plant species that the stomatal conductance showed no acclimation effect under elevated [CO_2] and stayed lower than for trees grown under ambient [CO_2] (Bettarini *et al.*, 1998; Herrick *et al.*, 2004).

Water use efficiency

The measured $\Delta^{13}C$ values are higher than those observed by Guehl *et al.* (1995) on young germination of pedunculate oaks, which was about 14 - 15 ‰ in optimal fertilisation conditions, thus indicating a lower water use efficiency in our experiment. However values were similar to the measurements made on wood cellulose of adult oaks by Ponton *et al.* (2001).

No modification of the measured isotopic discrimination was induced by changing [CO_2] concentration on atmosphere which is consistent with some short-term chambers experiments on several oak species (Picon *et al.*, 1997; Nguyen Tu *et al.*, 2004). However, it differs from others experiments including experiments on pedunculate oak (Picon *et al.*, 1996a) and some

long-term experiments where an elevation of the discrimination was found (Beerling & Woodward, 1995; Penuelas & Estiarte, 1997). A decrease in discrimination was also detected for the increasing atmospheric CO_2 concentration during the last centuries (Duquesnay *et al.*, 1998; Ponton *et al.*, 2001). However, responses of discrimination to elevated [CO_2] can also differ significantly between species as for the *Quercus* genus (Miglietta *et al.*, 1998). In agreement with our results, a hypothesis has been made for a possible "homeostatic" regulation of discrimination to [CO_2] variations (Ehleringer & Cerling, 1995; Marshall & Monserud, 1996). This regulation should be probably due to modifications of stomatal conductance, that would maintain the ratio Ci/Ca or the difference Ca-Ci (which is proportional to the ratio An/g_w according to the expression of WUE and the equations 1 and 2) at a constant value, which was visible on long-term experiments (Liu & Teskey, 1995; Nguyen Tu *et al.*, 2004). Another explanation could be the decrease of stomatal density on a large scale of with increasing [CO_2] (Wooward, 1993; Woodward & Kelly, 1995), However in experiments conducted on a single tree-generation, plants did not acclimate to elevated [CO_2] by reducing their stomatal density (Guehl *et al.*, 1994; Bettarini *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1998; Herrick *et al.*, 2004). In our case, the ratio Ci/Ca (data not shown) has progressively increased during the growing season (from 0.79 at t1 to 0.88 at t5). Ci/Ca estimated on trees grown under elevated [CO_2] was significantly higher compared to ambient [CO_2] (+5.7%) for the first measurement, but remained unchanged or slightly lower (max of -3.5%) for the rest of the growing season.

The distribution of the $\Delta^{13}C$ values within the population (data not shown) shows a larger range of values for trees grown under elevated [CO_2] than ambient [CO_2], suggesting that the elevated CO_2 increases the differences among genotypes. The weak but significant correlation of $\Delta^{13}C$ between ambient and elevated [CO_2] indicates that the overall ranking of genotypes remains, while still expressing individual responses. Such a conservation of ranks has also been documented for among year and treatment comparisons for leaf $\Delta^{13}C$ data of *Picea mariana* (Flanagan & Johnsen, 1995).

Difference between average leaf and cellulose discrimination nearly identical for the two CO_2 treatments, indicates that this difference in carbon composition is independent of the CO_2 level. Thus, for all data a higher discrimination was detected for leaf material compared to wood cellulose, which relates to a more negative $\Delta^{13}C$. Furthermore, the slope of the correlation being close to the bisector, the difference seems to be rather constant, even if there is substantial individual variation. One of the most obvious reasons for this difference is the biochemical composition of leaves, including lignin and lipids which have a more negative isotopic signature than sugars and thus would draw whole leaf material to more negative $\Delta^{13}C$ values, as has been found for *Pinus sylvestris* (Brendel *et al.*, 2003). As these composition differences are rather constant, so would also be the isotopic difference between whole leaf and wood cellulose. However, also the different integration periods of leaves compared to wood could be the cause of the detected constant difference. And finally also fractionation taking place during leaf sugar export and internal carbon cycling could change the isotopic composition of cellulose compared to leaf material.

We found a significant higher WUEi calculated from gas exchanges or discrimination under elevated [CO_2], what confirms the observations made on numerous experiments (e.g. Gorissen *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2002; Greenep *et al.*, 2003). On very large time-scale studies, generally made on herbarium plants, it has been estimated that WUE was increasing during the last centuries and more precisely since 1930 (Polley *et al.*, 1993; Woodward, 1993; Bert *et al.*, 1997). Some authors attributed this trend to the elevation of [CO_2] concentration on atmosphere (Beerling, 1996), although some authors found that WUE of three conifer species did not increased during the last century in spite of the progressive elevation of [CO_2] (Marshall & Monserud, 1996). In our experiment, due to an higher carbon assimilation and lower stomatal conductance, WUE calculated from gas exchanges was significantly higher under 680 vpm [CO_2] compare to 380 vpm [CO_2], from +15.4% for the first flush to nearly +100% for the third flush, and those proportions are consistent with previous studies on

pedunculate oaks (Picon *et al.*, 1997). WUE values calculated from discrimination showed the same trend, with a nearby 80 % enhancement of WUE under elevated [CO_2] compared to ambient, and if we refer to the equation (2), this enhancement was essentially due to the elevation of [CO_2] partial pressure on the air (Ca) as discrimination did not vary. This is in agreement with Duquesnay *et al.* (1998) observation's on wood-cellulose of beech for more than one century and Picon *et al.* (1997) on pedunculate oak. The distribution of WUE calculated from gas exchanges between [CO_2] treatments (Figure 2) showed a shift of the genotypes distribution toward higher WUE values under elevated [CO_2]. This individual response of some genotypes is reflected in the lack of rank conservation for t2 and t4 (Table 4), whereas ranks were conserved for these dates, even though not at a very high level, for assimilation rate and stomatal conductance.

QTLs

QTLs found for isotopic discrimination against ^{13}C were detected across CO_2 treatments on LG11 and LG2. On these linkage groups as well as on LG8, QTL were also detected in a different experiment on the same pedunculate oak full-sib family across two plantations and over three years (Brendel *et al.*, in preparation). This reveals a remarkable stability of the QTLs related to discrimination on these specific linkage groups. For gas exchange variables no QTL were repeatedly detected for the four measured points in time. The major cause for this is probably the extreme sensitivity of gas exchange to environmental variables, which one the one hand makes measurements on a whole family difficult as environmental conditions will change during the measurement tie required. On the other hand, different environmental variables might control gas exchange on the different measurement dates and thus increase of decrease the effect of QTL.

Significant QTLs were detected using the Multi-Environment analysis, either confirming significant or putative QTL detected in single environment analyses or indicating QTL not

detected before (e.g. For total dry weight on LG2male). Putative QTL were confirmed using ME analysis for SLA on the LG 3 of the male map, cellulose discrimination on the LG 9 of the female map, and total dry weight on the LG 12 of the male map. A number of significant QTL only detected for one CO_2 level could be confirmed using the more powerful ME analysis, for both levels, without showing a difference in effects between CO_2 levels. This was the case for the QTL detected for foliar $\Delta^{13}C$ on LG 2 or LG 8 of the male map, cellulose discrimination on LG 4 and LG 9 of the female map, stomatal conductance to water vapour on the LG 8 of the male map. For six QTL the statistical tests on the ME model indicated effects significantly different between CO_2 environments and thus an interaction between the environment and the QTL. This interaction was found for SLA (LG3m), stem diameter (LG12m), net carbon assimilation (LG9m), and for three QTL for WUE calculated from isotopic discrimination both on cellulose (LG9f and LG4m) and on leaf material (LG8m) (Table 6). To our knowledge, no results are available in the literature on the interaction of a specific QTL with a specific environmental effect, here CO_2.

We measured several morphological and physiological characters relating to WUE to determine if the physiologically correlated traits gave same QTLs or not, specific genome regions for genetic determinism of a metabolic way or not, and try to compare the male and female map using the similar makers between both maps. Some pairs of linkage groups can thus have been distinguished in relation to the presence of several QTLs on a same region. We used the term "co-localisation" among QTL in the meaning of "within a genomic region", as the precision of the position is not sufficiently high to infer hypotheses on common genetic determinisms, but rather defining genomic regions of interest. Significant QTLs related to foliar $\Delta^{13}C$ were found on LG2m and putative QTL for cellulose $\Delta^{13}C$ were found in a comparable genomic region on the female map. Further, QTL for SLA and the total DW were localised between both common markers on the female and male map, respectively. SLA and total DW might either directly be related via total leaf mass (these traits were significantly

correlated, data not shown) or indirectly via photosynthetic capacity influencing growth (MacFarlane *et al.*, 2004).

On LG 8f two separated groups of QTL can be distinguished. In the first intervals of the linkage group, QTL are located for foliar $\Delta^{13}C$ and derived WUE, with a specific response of the WUE QTL to $[CO_2]$ level. This hot spot of $\Delta^{13}C$ regulation was confirmed by Brendel *et al.* (in preparation) on the same genotypes. The second group of detected QTLs was found within the fifth interval, including several QTL (significant and putative) for stomatal conductance and one QTL for SLA. Both traits presented a significant correlation ($r = -0.33$), probably due to their direct relation with leaf surface, and although SLA was more strongly related to carbon assimilation ($r = -0.45$), no QTL was found for the last trait.

QTLs related to foliar water percentage and assimilation rate were detected on LG9m, whereas QTL for cellulose $\Delta^{13}C$ and WUE were detected LG 9f. The locations of significant and putative QTL for foliar and cellulose $\Delta^{13}C$ and derived WUE suggest the possibility of two genomic regions (intervals 2 and 4) for this trait on LG9. Further, within the second interval, putative QTL are found for assimilation rate and intrinsic WUE (An/g_w). This is a direct validation of the Farquhar model (Farquhar *et al.*, 1982) linking carbon isotope discrimination to WUE. The QTL for %W, which is correlated to foliar $\Delta^{13}C$ (Table 5) is found in a comparative interval on the male map. The QTL for assimilation rate, rather found in the first interval of the male map, could suggest, and together with the putative QTL for assimilation rate found on the LG9f, a region on LG9 that control WUE via assimilation. The ME-QTLs related to WUE calculated from cellulose $\Delta^{13}C$ presented a significant response to $[CO_2]$ elevation. However, the related percentage of explained variance was very low in both environments, so the influence of the QTL on the effective WUE response to $[CO_2]$ changes would be probably masked by the effect of the other QTLs that do not vary with the environment. The ME-QTL related to net carbon assimilation also respond significantly to

[CO_2] elevation, showing a loss of its substantial influence on A_n (PEV =11.4%) when the trees was submitted to high [CO_2] stressing the complexity involved physiological relationships.

The LG11 was of particular interest, as it presents on male map a considerable accumulation of detected QTLs within a relative restricted zone, nearby a microsatellite included in both parental genetic maps. First evident element is that three stable and significant QTLs were localised on this linkage group (QTLs were detected on both [CO_2] conditions and were confirmed by the multi-environment analysis): for SLA measured at t2, foliar $\Delta^{13}C$ and cellulose $\Delta^{13}C$, also detected by Brendel *et al.* (in preparation) at the same positions on the same oaks genotypes, as well as QTL for WUE derived from $\Delta^{13}C$. Additional QTL for foliar water percentage at elevated [CO_2] was detected close to the same genetic marker on the male as well as the female map. All those QTLs presented high PEV at ambient [CO_2] (17.3 % for the lowest value) that were lowered for discrimination or increased for SLA when the trees were submitted to elevated [CO_2], but without significant difference of their effects on the related traits between [CO_2] treatments. In addition to one significant QTL for root DW and several putative QTLs related to growth (biomass and diameter) were detected in the same region. Further a putative QTL was found for intrinsic WUE (An/g_w) nearby, however with an opposite effect, compared to the WUE QTL. This could suggest a separate QTL and thus a larger genomic region related to WUE. All these observations suggest the existence of one or several common regulation elements between the different traits in relation with the WUE. Experiments conducted on black spruce trees (Johnsen & Major, 1995) or on peanut (Hubick *et al.*, 1988) showed that the genetic variability in isotopic discrimination was induced by variations in photosynthetic capacity, rather than by stomatal conductance which did not vary significantly. However, in our experiment stomatal conductance varied considerably and was correlated to carbon isotope discrimination, whereas assimilation rate was not. Further detailed investigations are necessary to determine the physiological regulation of water use efficiency as well as its genetic determinism.

At last, the linkage group 12 presented nearly exclusively QTLs for growth traits with significant and putative QTL for dry weight and diameter growth on the male map and a significant QTL for height growth on the female map. In particular, QTL for diameter and total dry weight co-localised within the same interval, of which only the QTL for diameter showed a effect responding to the [CO_2] with a lower PEV and effect under high [CO_2]. This could be of particular interest for eventual tree selection for growth and production under future elevated CO_2 scenarios.

Conclusion

Results obtained for instantaneous WUE give a first estimation of the trees ability to face to drought, according to the conclusion of Widodo *et al.* (2003) who found that the elevation of [CO_2] delayed a possible drought stress. In this experiment we found four hot spots for water use efficiency and some co-localisation with foliar anatomy. Masle *et al.* (2005) found the ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis* and this gene contributes to leaf anatomical features as stomatal density. Thus, genetic determinism is of great importance to know for future genotypes selection projects, but environmental fingerprint on trees behaviour has to be taken account, as Polle *et al.* (2001) showed the influence of parents provenance and history on offspring response to elevated [CO_2]. Norby *et al.* (1999) also underline the fact that observed responses during short-term experiments cannot be used to estimate entire forest behaviour. The ME analysis complemented with effects estimation gives very interesting data, to our knowledge probably one of the first published results at the day concerning specific QTLs of trees response to elevated [CO_2].

Acknowledgements

Xavière Torti was supported by a Ph.D. grant from the Ministère de la Recherche, France. The authors are grateful to François Willm, Nathalie Ningre, Patrick Gross for their excellent technical assistance. A special thanks to the Professor A. Korol for his helpful assistance for the MultiQTL software mastering.

References

Ainsworth EA, Long SP. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO_2 enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO_2. *New Phytologist* **165:** 351-372.

Anderson PD, Tomlinson PT. 1998. Ontogeny affects response of northern red oak seedlings to elevated CO_2 and water stress. I. Carbon assimilation and biomass production. *New Phytologist* **140:** 477-491.

Arp WJ. 1991. Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO_2. *Plant, Cell and Environment* **14:** 869-875.

Badeck F-W, Dufrêne E, Epron D, Le Dantec V, Liozon R, Mousseau M, Pontallier J-Y, Saugier B. 1997. Sweet-chestnut and Beech saplings under elevated CO_2. In: Mohren GMJea, ed. *Impacts of Gobal Change on Tree Physiology and Forest Ecosystems*: Kluwer Academic. 15-25.

Barreneche T, Bodenes C, Lexer C, Trontin J-F, Fluch S, Streiff R, Plomion C, Roussel G, Steinkellner H, Burg K, Favre J-M, Glössl J, Kremer A. 1998. A genetic linkage map of Quercus robur L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theorical Applied in Genetics* **97:** 1090-1103.

Beerling DJ. 1996. Ecophysiological responses of woody plants to past CO_2 concentrations. *Tree Physiology* **16:** 389-396.

Beerling DG, Woodward FI. 1995. Leaf stable carbon isotope composition records increased water-use efficiency of C3 plants in response to atmospheric CO_2 enrichment. *Functional Ecology* **9:** 394-401.

Bert GD, Leavitt SW, Dupouey JL. 1997. Variations of wood $\delta^{13}C$ and water-use efficiency of *Abies alba* (Mill.) during the last century. *Ecology* **78**: 1588-1596.

Bettarini I, Vaccari FP, Miglietta F. 1998. Elevated CO_2 concentrations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO_2 spring in central Italy. *Global Change Biology* **4:** 17-22.

Booker FL, Reid CD, Brunschön-Harti S, Fiscus EL, Miller JE. 1997. Photosynthesis and photorespiration in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. *Journal of Experimental Botany* **48:** 1843-1852.

Bowes G. 1991. Growth at elevated CO_2 : photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant, Cell and Environment* **14:** 795-806.

Bradshaw HD, Grattapaglia D. 1994. QTL mapping in interspecific hybrids of forest trees. *Forest Genetics* **1:** 191-196.

Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J-M. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}C$ and ring width in maritime pine. *Plant, Cell and Environment* **25:** 945-953.

Brendel O, Handley L, Griffiths H. 2003. The $\delta^{13}C$ of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles: spatial and temporal variations. *Annals of Forest Science* **60:** 97-104.

Brown GR, Bassoni DL, Gill GP, Fontana JR, Wheeler NC, Megraw RA, Davis MF, Sewell MM, Tuskan GA, Neale DB. 2003. Identification of Quantitative Trait Loci Influencing Wood Property Traits in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL Verification and Candidate Gene Mapping. *Genetics* **164:** 1537-1546.

Bunce JA. 1992. Stomatal conductance, photosynthesis and respiration of temperate deciduous tree seedlings grown outdoors at an elevated concentration of carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* **15:** 541-549.

Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F. 2004. Identification of QTLs affecting adaptative traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant, Cell and Environment* **27:** 1088-1101.

Ceulemans R, Janssens IA, Jach ME. 1999. Effects of CO_2 enrichment on trees and forests: lessons to be learned in view of future ecosystem studies. *Annals of Botany* **84:** 577-590.

Ceulemans R, Mousseau M. 1994. Effects of elevated atmospheric CO_2 on woody plants. *New Phytologist* **127:** 425-446.

Ciais P. 1999. Restless carbon pools. *Nature* **398:** 111-112.

Costa P, Plomion C. 1999. Genetic analysis of needle proteins in maritime pine. 2. Variation of protein accumulation. *Silvae Genetica* **48:** 146-150.

Curtis PS, Vogel CS, Pregitzer KS, Zak DR, Teeri JA. 1995. Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO_2 on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus x euramericana* (Dode) Guinier. *New Phytologist* **129**, 253-263.

Curtis PS, Wang X. 1998. A meta-analysis of elevated CO_2 effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* **113:** 299-313.

Devey ME, Carson SD, Nolan MF, Matheson AC, Te Riini C, Hohepa J. 2004. QTL associations for density and diameter in *Pinus radiata* and the potential for marker-aided selection. *Theorical Applied in Genetics* **108:** 516-524.

Dixon RK, Brown S, Houghton RA, Solomon AM, Trexler MC, Wisniewski J. 1994. Carbon pools and flux of global forest ecosystems. *Science* **263:** 185-190.

Duquesnay A, Breda N, Stievenard M, Dupouey JL. 1998. Changes of tree-ring d13C and water-use efficiency of beech (Fagus sylvatica L.) in north-eastern France during the past century. *Plant, Cell and Environment* **21:** 565-572.

Ehleringer JR, Cerling TE. 1995. Atmospheric CO_2 and the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentrations in plants. *Tree Physiology* **15:** 105-111.

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

Etheridge DM, Steele LP, Langenfelds RL, Defrancey RJ, Barnola J-M, Morgan VI. 1998. Historical CO_2 records from the Law Dome DE08, DE08-2, and DSS ice cores. *A*

Compendium of Data on Global Change. Oak Ridge, Tenn., U.S.A.: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy.

Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9:** 121-137.

Farquhar GD, Richards RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11:** 539-552.

Farquhar GD, Ehleringer J, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40:** 503-537.

Farrar JF, Williams ML. 1991. The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell and Environment* **14:** 819-830.

Flanagan LB, Jonhsen KH. 1995. Genetic variation in carbon isotope discrimination and its relationship to growth under field conditions in full-sib families of *Picea mariana*. *Canadian Journal of Forest Research* **25:** 39-47.

Gielen B, Ceulemans R. 2001. The likely impact of rising atmospheric CO_2 on natural and managed *Populus*: a literature review. *Environmental Pollution* **115:** 335-358.

Gonzalez-Meler MA, Taneva L, Trueman RJ. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO_2 concentration: cellular responses and global significance. *Annals of Botany* **94:** 647-656.

Gorissen A, Kuikman PJ, Van De Beek H. 1995. Carbon allocation and water use in juvenile Douglas fir under elevated CO_2. *New Phytologist* **129:** 275-282.

Greenep H, Turnbull MH, Whitehead D. 2003. Response of photosynthesis in second-generation *Pinus radiata* trees to long-term exposure to elevated carbon dioxide partial pressure. *Tree Physiology* **23:** 569-576.

Guehl J-M, Fort C, Ferhi A. 1995. Differential response of leaf conductance, carbon isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak plants. *New Phytologist* **131:** 149-157.

Guehl J-M, Picon C, Aussenac G, Gross P. 1994. Interactive effects of elevated CO2 and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two european forest tree species. *Tree Physiology* **14:** 707-724.

Gunderson CA, Norby RJ, Wullschleger S. 1993. Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during three years of growth in elevated CO_2: no loss of photosynthetic enhancement. *Plant, Cell and Environment* **16:** 797-807.

Herrick JD, Maherali H, Thomas RB. 2004. Reduced stomatal conductance in sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) sustained over long-term CO_2 enrichment. *New Phytologist* **162:** 387-396.

Hubick KT, Shorter R, Farqhuar GD. 1988. Heritability and genotype x environment interactions of carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* **15:** 799-813.

IPCC. 2001. A report of working group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change; *Cambridge University Press*. Data available at the URL: http://www.ipcc.ch/

Jach ME, Ceulemans R. 1997. Impact of elevated CO_2 on physiology and needle morphology of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. In: al. GMJMe, ed. *Impacts of global change on Tree Physiology and Forest Ecosystems*: Kluwer Academic. 67-73.

Jansen RC, Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* **136:** 1447-1455.

Jansen RC, Van Ooijen JW, Stam P, Lister C, Dean C. 1995. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. *Theorical Applied Genetics* **91**: 33-37.

Jermstad KD, Bassoni DL, Jech KS, Ritchie GA, Wheeler NC, Neale DB. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas Fir. III. Quantitative trait loci-by-environment interactions. *Genetics* **165:** 1489-1506.

Johnsen KH, Major JE. 1995. Gas exchange of 20-year-old black spruce families displaying a genetic x environmental interaction in growth rate. *Canadian Journal of Forest Research* **25**: 430-439.

Johnson JD, Tognetti R, Paris P. 2002. Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO_2. *Physiologia Plantarum* **115:** 93-100.

Kruse J, Hetzger I, Mai C, Polle A, Rennenberg H. 2003. Elevated pCO_2 affects N-metabolism of young poplar plants (*Populus tremula* x *P.alba*) differently at deficient and sufficient N-supply. *New Phytologist* **157:** 65-81.

Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121:** 185-199.

Lerceteau E, Szmidt AE, Andersson B. 2001. Detection of quantitative trait loci in *Pinus sylvestris* L. across years. *Euphytica* **121:** 117-122.

Lewis JD, Lucash M, Olszyk D, Tingey DT. 2004. Relationships between needle nitrogen concentration and photosynthetic responses of Douglas-fir seedlings to elevated CO_2 and temperature. *New Phytologist* **162:** 355-364.

Liu SR, Barto C, Lee H, Jarvis PG, Durrant D. 2002. Long-term response of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to CO_2 enrichment and nitrogen supply. I. Growth, biomass allocation and physiology. *Plant Biosystems* **136**: 189-198.

Liu SR, Teskey RO. 1995. Responses of foliar gas exchange to long-term elevated CO_2 concentrations in mature loblolly pine trees. *Tree Physiology* **15:** 351-359.

Loader NJ, Robertson I, Barker AC, Switsur VR, Waterhouse JS. 1997. A modified method for the batch processing of small whole wood samples to α-cellulose. *Chemical Geology* **136:** 313-317.

Lopez B, Sabate S, Ruiz I, Gracia C. 1997. Effects of elevated CO_2 and decreased water availability on Holm-Oak seedlings in controlled environment chambers. In: Mohren GMJea, ed. *Impacts of Gobal Change on Tree Physiology and Forest Ecosystems*: Kluwer Academic. 125-133.

Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heineke D, Geiger M, Stitt M, Müller-Röber BT, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB. 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO_2. *FEBS Letters* **429:** 147-151.

MacFarlane C, Adams MA, White DA. 2004. Productivity, carbon isotope discrimination and leaf traits of trees of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to water availability. *Plant, Cell and Environment* **27:** 1515-1524.

Maillard P, Guehl J-M, Muller J-F, Gross P. 2001. Interactive effects of elevated CO_2 concentration and nitrogen supply on partitioning of newly fixed ^{13}C and ^{15}N between shoot and roots of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur*). *Tree Physiology* **21:** 163-172.

Maroco JP, Breia E, Faria T, Pereira JS, Chaves MM. 2002. Effects of long-term exposure to elevated CO_2 and N fertilization on the development of photosynthetic capacity and biomass accumulation in *Quercus suber* L. *Plant, Cell and Environment* **25:** 105-113.

Marshall JD, Monserud RA. 1996. Homeostatic gas-exchange parameters inferred from $^{13}C/^{12}C$ in tree rings of conifers. *Oecologia* **105:** 13-21.

Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD. 2005. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* **doi**:10.1038/nature03835.

Medlyn BE, Badeck F-W, Pury DGG, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, Angelis P, Forstreuter M, Jach ME, Kellomäki S, Laitat E, Marek MV, Philippot S, Rey A, Strassemeyer J, Laitinen K, Liozon R, Portier B, Roberntz P, Wang K, Jarvis PG. 1999. Effects of elevated CO_2 on photosynthesis in European forest species: a meta-analysis of model parameters. *Plant, Cell and Environment* **22:** 1475-1495.

Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, De Angelis P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomäki S, Laitat E, Rey A, Roberntz P, Sigurdsson BD, Strassemeyer J, Wang K, Curtis PS, Jarvis PG. 2001. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO_2 concentration: a synthesis. *New Phytologist* **149**: 247-264.

Melillo JM, McGuire AD, Kicklighter DW, Moore BI, Vorosmarty J, Schloss AL. 1993. Global climate change and terrestrial net primary production. *Nature* **363:** 234-240.

Miglietta F, Bettarini I, Raschi A, Körner C, Vaccari FP. 1998. Isotope discrimination and photosynthesis of vegetation growing in the Bossoleto CO_2 spring. *Chemosphere* **36:** 771-776.

Mousseau M, Saugier B. 1992. The direct effect of increased CO_2 on gas exchange and growth of forest tree species. *Journal of Experimental Botany* **43:** 1121-1130.

Nguyen Tu TT, Kürschner WM, Schouten S, Van Bergen PF. 2004. Leaf carbon isotope composition of fossil and extant oaks grown under differing atmospheric CO_2 levels. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **212:** 199-213.

Norby RJ, Wullschleger SD, Gunderson CA, Nietch CT. 1995. Increased growth efficiency of *Quercus alba* trees in a CO_2-enriched atmosphere. *New Phytologist* **131:** 91-97.

Norby RJ, Wullschleger SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R. 1999. Tree responses to rising CO_2 in field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell and Environment* **22:** 683-714.

Oksanen E, Sober J, Karnosky DF. 2001. Impacts of elevated CO_2 and/or O_3 on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. *Environmental Pollution* **115:** 437-446.

Paul MJ, Pellny TK. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54:** 539-547.

Penuelas J, Estiarte M. 1997. Trends in plant carbon concentration and plant demand for nitrogen throughout this century. *Oecologia* **109:** 69-73.

Pettersson R, McDonald AJS. 1992. Effects of elevated carbon dioxide concentration on photosynthesis and growth of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) at optimal nutrition. *Plant, Cell and Environment* **15:** 911-919.

Picon C, Guehl J-M, Aussenac G. 1996a. Growth dynamics, transpiration and water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO_2 and drought. *Annals of Forest Science* **53:** 431-446.

Picon C, Guehl J-M, Ferhi A. 1996b. Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO_2.

Picon C, Ferhi A, Guehl J-M. 1997. Concentration and $d^{13}C$ of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO_2 and drought. *Journal of Experimental Botany* **48:** 1547-1556.

Polle A, Mc Kee IF, Blaschke L. 2001. Altered physiological and growth responses to elevated [CO_2] in offspring from holm oak (*Quercus ilex* L.) mother trees with lifetime exposure to naturally elevated [CO_2]. *Plant, Cell and Environment* **24:** 1075-1083.

Polley HW, Johnson HB, Marino BD, Mayeux HS. 1993. Increase in C3 plant water-use efficiency and biomass over Glacial to present concentrations. *Nature* **361**: 61-64.

Ponton S, Dupouey JL, Breda N, Bodenes C, Dreyer E. 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant, Cell and Environment* **24:** 861-868.

Pregitzer KS, Zak DR, Curtis PS, Kubiske ME, Teeri JA, Vogel CS. 1995. Atmospheric CO_2, soil nitrogen and turnover of fine roots. *New Phytologist* **129:** 579-585.

Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM. 1999. Elevated CO_2 and plant structure: a review. *Global Change Biology* **5:** 807-837.

Radoglou KM, Jarvis PG. 1990. Effects of CO_2 enrichment on four poplar clones. I. Growth and leaf anatomy. *Annals of Botany* **65:** 617-626.

Reddy KR, Robana RR, Hodges HF, Liu XJ, Mc Kinion JM. 1998. Interactions of CO_2 enrichment and temperature on cotton growth and leaf characteristics. *Environmental & Experimental Botany* **39:** 117-129.

Rey A, Jarvis PG. 1997. Long-term photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO_2 in birch (*Betula pendula* Roth.). In: *Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems.* Mohren GMJ, ed.; Kluwer Academic Press. pp. 87-91.

Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Pot D, Plomion C, Kremer A. 2004. Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity* **92:** 20-30.

Saxe H, Ellsworth DS, Heath J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO_2 atmosphere. *New Phytologist* **139:** 395-436.

Scalfi M, Troggio M, Piovani P, Leonardi S, Magnaschi G, Vendramin GG, Menozzi P. 2004. A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theorical Applied in Genetics* **108:** 433-441.

Scotti-SAintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C, Kremer A. 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. *Theorical Applied in Genetics* **109:** 1648-1659.

Sholtis JD, Gunderson CA, Norby RJ, Tissue DT. 2004. Persistent stimulation of photosynthesis by elevated CO_2 in a sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) forest stand. *New Phytologist* **162:** 343-354.

Stitt M. 1991. Rising CO_2 levels and their potential significance for carbon flow in photosyntetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14:** 741-762.

Taylor G, Tricker PJ, Zhang FZ, Alston VJ, Miglietta F, Kuzminsky E. 2003. Spatial and temporal effects of free-air CO_2 enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion and production in a closed canopy of *Populus*. *Plant Physiology* **131**: 177-185.

Thamarus K, Groom K, Bradley A, Raymond CA, Schimleck LR, Williams ER, MORAN GF. 2004. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. *Theorical Applied in Genetics* **109:** 856-864.

Tjoelker MG, Oleksyn J, Reich PB. 1998. Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO_2 and temperature. *Tree Physiology* **18:** 715-726.

Tognetti R, Johnson JD. 1999. Responses to elevated atmospheric CO_2 concentration and nitrogen supply of *Quercus ilex* L. seedlings from a coppice stand growing at a natural CO_2 spring. *Annals of Forest Science* **56:** 549-561.

Tricker PJ, Calfapietra C, Kuzminsky E, Puleggi R, Ferris R, Nathoo M, Pleasants LJ, Alstoon V, De Angelis P, Taylor G. 2004. Long-term acclimation of leaf production, development, longevity and quality following 3 yr exposure to free-air CO_2 enrichment during canopy closure in *Populus*. *New Phytologist* **162:** 413-426.

Tsarouhas V, Gullberg U, Lagercrantz U. 2004. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) affecting autumn freezing resistance and phenology in *Salix*. *Theorical Applied in Genetics* **108:** 1335-1342.

Visscher PM, Thompson R, Haley CS. 1996. Confidence Intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* **143:** 1013-1020.

Vivin P, Guehl J-M, Clement A, Aussenac G. 1996. The effects of elevated CO_2 and water stress on whole plant CO_2 exchange, carbon allocation and osmoregulation in oak seedlings. *Annals of Forest Science* **53:** 447-459.

Wan S, Norby RJ, Pregitzer KS, Ledford J, O'Neill EG. 2004. CO_2 enrichment and warming of the atmosphere enhance both productivity and mortality of maple tree fine roots. *New Phytologist* **162:** 437-446.

Widodo W, Vu JCV, Boote KJ, Baker JT, and Allen LHJ. 2003. Elevated growth CO_2 delays drought stress and accelerates recovery of rice leaf photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 259-272.

Woodward FI. 1993. Plants responses to past concentrations of CO_2. *Vegetatio* **104/105:** 145-155.

Woodward FI. 2002. Potential impacts of global elevated CO_2 concentrations on plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 207-211.

Woodward FI, Kelly GJ. 1995. The influence of CO_2 concentration on stomatal density. *New Phytologist* **131**: 311-327.

Wullschleger S, Tschaplinski TJ, Norby RJ. 2002. Plant water relations at elevated CO_2 - implications for water-limited environments. *Plant, Cell and Environment* **25:** 319-331.

Zeng Z-B. 1994. Precision Mapping of Quantitative trait loci. *Genetics* **136:** 1457-1468.

	Julian Day	Temperature (°C)		% Relative Humidity		PPFD		Measurements
		Gh 1	Gh 2	Gh 1	Gh 2	Gh 1	Gh 2	
t0	132	-	-	-	-	-	-	Stem diameter and height
t1	149	26.2	22.3	73.1	62.7	912	914	Gas exchanges
t2	177	21.4	21.3	71.9	68.1	746	747	Gas exchanges, Foliar parameters
t3	204	26.9	27.2	65.9	60.4	970	972	Gas exchanges
t4	234	23.9	23.9	59.9	61.6	820	880	Gas exchanges
t5	271	18.5	17.2	54.6	56.1	639	668	Stem diameter and height, $\Delta^{13}C$, Gas exchanges, Foliar parameters

Table 1 Microclimatic conditions under the glasshouses (average CO_2 concentrations on the measurements period: Gh 1 = 380 vpm [CO_2]; Gh 2 = 680 vpm [CO_2]) and description of the measurements done on pedunculate oaks during the year 2001. Averages of temperature, Relative Humidity and Photosynthetic Photon Flux Density (µmol m^{-2} s^{-1}) were calculated on the time scale fixed for measurements (08:30 to 11:00 UT).

	t5	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**
Stem height (cm)	181.63 ± 4.48 b	227.91 ± 5.04 a
Stem diameter (cm)	15.86 ± 0.25 b	17.45 ± 0.26 a
Leaves biomass (g DW)	39.32 ± 1.21 b	53.44 ± 1.46 a
Stems biomass (g DW)	98.14 ± 3.74 b	142.38 ± 4.64 a
Roots biomass (g DW)	42.45 ± 1.97 b	64.92 ± 2.90 a
Total biomass (g DW)	179.91 ± 6.50 b	260.74 ± 8.36 a
Root / Shoot ratio	0.5 ± 0.007 b	0.527 ± 0.007 a

Table 2 Stem height and diameter, and biomass repartition (± se) of trees grown under 380 vpm or 680 vpm [CO_2] measured on the mature third flush (t5, julian day 271). Small letters show significant differences between the responses (ANOVA & t-test for dependant samples, $p<0.05$).

	t2		t5	
	380 vpm [CO2]	**680 vpm [CO2]**	**380 vpm [CO2]**	**680 vpm [CO2]**
Foliar water percentage (%)	61.74 ± 0.23 a	59.6 ± 0.32 b	61.397 ± 0.17 a	61.79 ± 0.16 a
Average leaf area (cm^2)	19.92 ± 0.47 a	19.06 ± 0.48 a	17.75 ± 0.46 b	17.94 ± 0.50 b
Specific Leaf Area ($cm^2.g^{-1}$)	158.84 ± 1.82 a	139.16 ± 2.04 c	151.12 ± 2.00 b	144.77 ± 2.17 bc

Table 3 Leaves water and mass per surface characteristics (± se) of trees grown under 380 vpm or 680 vpm [CO_2] measured on the second (t2, julian day 177) and the mature third flush (t5, julian day 271). Small letters show significant differences between the responses. (ANOVA and t-test for dependant samples, $p<0.05$).

	t1		t2		t3		t4		t5	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
A_n	**0.302**	0.000	**0.264**	0.001	**0.297**	0.000	**0.195**	0.023	**0.241**	0.006
g_w	**0.188**	0.015	**0.256**	0.002	**0.201**	0.013	**0.235**	0.009	0.093	0.319
A_n/g_w	**0.195**	0.011	0.031	0.705	**0.162**	0.047	-0.047	0.602	**0.225**	0.013

Table 4 Spearman's coefficient (r) and significance (ranks are conserved if $p < 0.05$) of gas exchanges non-linear correlation between trees grown under 380 vpm or 680 vpm [CO_2] for the five measurement days (t1 = julian day 149; t2 = julian day 177; t3 = julian day 204, t4 = julian day 234, t5 = julian day 271).

		% W	SLA	A_n	g_w	A_n / g_w
Foliar $\Delta^{13}C$	**380 vpm**	r = 0.22	r = 0.32	ns	Ave F3: r = 0.25	Ave F3: ns
					Ave: r = 0.32	Ave : r = - 0.26
	680 vpm	r = 0.22	r = 0.26	ns	ns	ns
Cellular $\Delta^{13}C$	**380 vpm**	ns	ns	ns	Ave F3: r = 0.31	Ave F3: ns
					Ave : r = 0.37	Ave : r = -0.27
	680 vpm	ns	ns	ns	Ave F3: r = 0.28	Ave F3: ns
					Ave : r = 0.29	Ave : r = - 0.24

Table 5 Correlation coefficient (r, significance at $p < 0.01$) between isotopic discrimination against ^{13}C and foliar characteristics (water percentage and SLA) and gas exchanges averages (**Ave F3**: average on the third flush measurements, t3 to t5; **Ave**: average on the five measurements, t1 to t5) for trees grown under 380 vpm or 680 vpm [CO_2].

Trait	Map	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effect	p_{gen}	PEV
Foliar Water Content	Female	680 vpm - t5	11	17.5 ± 4	4.31	147	-1.56	0.012 ***	12.5
	Male	380 vpm - t5	9	21.3 ± 18.3	2.73	132	1.35	0.024 ***	9.8
		680 vpm - t2	2	67.5 ± 15.3	2.14	127	2.21	0.121 *	7
			11	61.9 ± 6.41	5.85	154	-3.29	0.000 ***	15.8
SLA	Female	380 vpm – t5	2	51.6 ± 13	2.58	164	14.9	0.036 ***	8
	Male	380 vpm – t2	8	58 ± 12	3.08	122	15.21	0.000 ***	9.2
			11	33.1 ± 20.8	4.68	133	-17.33	0.000 ***	11.9
		680 vpm – t2	11	57.8 ± 5.99	5.15	153	-21.04	0.000 ***	15.6
		680 vpm – t5	3	46.8 ± 9.55	2.3	133	-16.81	0.111 *	8
Cellulose $\Delta^{13}C$	Female	380 vpm – t5	2	26.7 ± 21.6	2.19	142	0.59	0.161 +	6.2
			4	93.7 ± 10.9	4.43	142	-0.82	0.000 ***	14.1
		680 vpm – t5	9	49.4 ± 27.3	2.18	157	0.64	0.158 +	5.5
	Male	380 vpm – t5	11	55.8 ± 5.12	9.53	161	1.14	0.000 ***	24.1
		680 vpm – t5	11	48.7 ± 22.9	4.46	165	0.92	0.000 ***	12
Foliar $\Delta^{13}C$	Female	380 vpm – t5	2	40.2 ± 20.6	2	149	0.52	0.176 +	6
		680 vpm – t5	9	27.7 ± 25.1	2.44	136	0.82	0.082 **	8.4
	Male	380 vpm – t5	2	71.2 ± 34.2	1.95	119	-0.51	0.168 +	6.1
			11	66.6 ± 7.44	6.81	154	0.88	0.000 ***	17.3
		680 vpm – t5	2	62.8 ± 27.5	2.18	125	-0.72	0.000 ***	6.7
			8	25.4 ± 19.5	2.99	127	-0.86	0.021 ***	10
			11	61.7 ± 16.3	5.27	153	0.93	0.000 ***	12.1
Total Dry Weight	Male	380 vpm	11	46 ± 19.2	2.16	150	43.49	0.078 **	6.2
			12	22.9 ± 15.9	2.54	89	61.157	0.097 **	12
Roots Dry Weight	Male	380 vpm	11	47 ± 23.5	2.48	150	15.03	0.04 ***	7.8
Stem Dry Weight	Male	380 vpm	11	46.5 ± 18.6	2.17	150	23.99	0.137 *	5.7
			12	18.9 ± 12.3	2.79	89	37.39	0.057 **	13.7
Stem Diameter	Male	380 vpm – t0	12	10.7 ± 7.82	2.2	89	0.97	0.162 +	10.9
		380 vpm – t5	11	50.3 ± 20.3	2.03	150	1.61	0.186 +	5.8
			12	16.9 ± 10	2.86	90	2.49	0.029 ***	13.4
Stem Height	Female	380 vpm – t0	12	48.4 ± 5.44	3.3	142	-8.91	0.018 ***	10.2
		680 vpm – t0	4	18.1 ± 10.1	3.17	144	-8.4	0.016 ***	9.7

Trait	Map	Conditions	LG	Loci (cM)	LOD	n	Effect	p_{gen}	PEV
A	Female	380 vpm – t4	9	48.5 ± 13.2	2.6	102	3.41	0.115 *	11
		680 vpm - Ave	4	81.4 ± 34.3	2.17	148	1.24	0.186 +	6.2
			11	41.5 ± 12.7	3.31	137	-2.23	0.104 *	13.1
			11	64.7 ± 10.2	3.31	137	2.734	0.104 *	13.1
			12	36.8 ± 14.2	2.71	141	-1.56	0.087 **	8.4
		680 vpm – Ave F3	4	90.5 ± 28	2.15	126	1.55	0.108 *	7.3
	Male	380 vpm – t3	9	0.89 ± 5.83	4.37	134	-3.35	0.000 ***	13.3
			12	9.63 ± 11.8	2.36	85	3.12	0.124 *	12.2
		680 vpm – t3	5	52.5 ± 20.7	2.56	140	-3.12	0.109 *	9.5
			6	19.3 ± 7.84	3.49	136	3.29	0.000 ***	10
g_w	Female	380 vpm – t1	5	78.1 ± 18.7	2.57	151	6.2	0.041 ***	8.3
			7	36.1 ± 10.6	3.56	114	7.61	0.115 *	9.7
			7	74 ± 6.09	3.56	114	-7.03	0.115 *	9.7
		380 vpm – t2	3	1.89 ± 3.53	3.02	96	10.91	0.048 ***	13.5
			3	31.5 ± 1.05	3.02	96	-11.68	0.048 ***	13.5
			7	46.1 ± 20.2	2.08	139	7.37	0.158 +	6.6
		680 vpm – t1	11	43.3 ± 9.52	2.37	146	5.58	0.137 *	6.5
		680 vpm – t3	12	30.6 ± 21.7	2.1	133	-4.74	0.104 *	6.4
	Male	380 vpm – t2	6	21.3 ± 9.55	2	144	7.01	0.198 +	6.5
		380 vpm – t3	9	5.86 ± 14.3	2.21	133	-9.98	0.115 *	7.4
		680 vpm – t1	9	70.9 ± 9.15	2.84	146	6.29	0.104 *	8.9
		680 vpm – t4	8	63.3 ± 17.5	3.64	123	-9.12	0.000 ***	12.6
			10	66.3 ± 17.5	2.3	128	-6.9	0.093 **	7.3
		380 vpm – Ave F3	6	4.36 ± 10.8	2.38	107	6.14	0.111 *	9.4
			10	37.4 ± 10.8	3.51	122	-7.58	0.012 ***	12.2
		680 vpm – Ave F3	8	57.9 ± 21.8	2.66	107	-5.31	0.061 **	13
A/g	Female	380 vpm - t1	10	11 ± 10.6	2.64	142	-9.26	0.036 ***	8.3
		680 vpm - t1	11	44.1 ± 8.13	2.46	147	-14.1	0.126 *	8.9
		380 vpm - t2	7	75 ± 24.2	2.01	96	-9.9	0.168 +	8.8
		680 vpm - t3	1	45.6 ± 16.9	2.16	143	-17.07	0.126 *	6.3
	Male	380 vpm – t2	6	25.6 ± 9.62	2.38	144	-10.04	0.136 *	7.6
			11	43.3 ± 22.5	2.18	141	9.15	0.137 *	6.4
		380 vpm – t3	4	13.7 ± 15.3	2.11	148	-7.46	0.188 +	6.4
		380 vpm – Ave	8	44.6 ± 26.5	2.06	143	5.05	0.173 +	7
		680 vpm – Ave F3	10	34.4 ± 10.3	2.15	114	9.07	0.178 +	7.3

Table 5 Results of the QTLs detection using Composite Interval Mapping of the MultiQTL software, relative to gas exchange, foliar characteristics, $\Delta^{13}C$ and growth traits.

Presented data show the parental genetic **Map** used for QTL detection, the **Conditions** ($[CO_2]$ and time) of quantitative analysis, the **LG** (Linkage Group), **Loci** (cM; LOD score peak position from the top of the linkage group ± standard deviation calculated using boostrap test), **LOD**, **n** (number of full-sibs with available data used for QTL detection), **Effect** (estimated effect of the presence of the QTL on quantitative response), $\mathbf{p_{gen}}$ (probability at the genome level; *Significant QTL* : *** $p<0.05$; *Putative QTLs*: ** $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.15$, + $0.15<p<0.2$), **PEV** (Percentage of Explained Variance by the presence of the QTL).

Trait	Map	Date	LG	Loci (cM)	LOD	380 vpm			680 vpm			P_{gen}	$P_{gen,EE}$	P_{mod}	CO_2 effect
						n	Effect	PEV	n	Effect	PEV				
A_n (norm.)	Female	t5	7	83 ± 24.1	2.89	93	-0.55	7.9	99	-0.45	5.5	0.071 **	0.115 *	ns	no
	Male	t3	9	2.44 ± 9.62	3.59	134	-0.68	11.4	131	0.06	0.1	0.024 ***	0.115 *	0.006 ***	yes
			12	9.4 ± 13.7	2.59	85	0.71	13	85	0.09	0.2	0.136 *	0.266	ns	no
g_{sw} (norm.)	Female	t1	11	45 ± 10.5	2.8	147	0.06	0.1	146	0.61	8.8	0.158 +	0.436	0.025 ***	yes
		t2	7	39.3 ± 16.6	2.57	139	0.53	6.6	138	0.32	2.5	0.115 *	0.147 *	ns	no
	Male	t4	8	63 ± 17.7	3.1	131	-0.18	0.8	123	-0.63	10.4	0.09 **	0.01 ***	ns	no
			10	61.5 ± 19.4	2.84	132	-0.28	2.1	128	-0.52	7.1	0.178 +	0.093 **	ns	no
		AveF3	8	58.4 ± 19.1	3.58	108	-0.26	1.9	107	-0.773	15.2	0.015 ***	0.015 ***	ns	no
			10	56.9 ± 21.5	3.37	108	-0.56	8.6	112	-0.4	4.4	0.053 **	0.027 ***	ns	no
WUE = A/g (norm.)	Female	t3	9	51.7 ± 15.9	2.74	104	-0.37	3.5	103	-0.57	8	0.147 *	0.283	ns	no
WUE	Female	t5	2	21.4 ± 18.1	3.04	142	-5.09	4.5	145	-14.18	3.8	0.071 **	0.079 **	ns	no
= f (cellulose $\Delta^{13}C$)			9	30.5 ± 29.1	3.53	141	-2.73	1.3	145	-14.16	3.9	0.048 ***	0.093 **	0.007 ***	yes
			11	15.7 ± 10.8	3.24	153	5.33	4.7	157	14.29	4.1	0.071 **	0.036 ***	ns	no
	Male	t5	4	65.1 ± 21.1	3.26	109	-6.03	6.3	113	-17.21	5	0.024 ***	0.048 ***	0.014 ***	yes
			11	54.8 ± 10.6	10.33	161	-11.07	21.5	165	-13.31	3.1	0.000 ***	0.000 ***	ns	no
WUE	Female	t5	9	52.6 ± 25.1	3.67	150	-4.53	4.6	147	-11.77	6	0.012 ***	0.017 ***	ns	no
= f (foliar $\Delta^{13}C$)	Male	t5	8	12.7 ± 17.5	5.4	127	4.7	4.4	123	15.59	11	0.000 ***	0.000 ***	0.009 ***	yes
			11	66.8 ± 7.05	11.51	154	-9.12	16.4	151	-14.71	10.2	0.000 ***	0.000 ***	ns	no
Cellulose $\Delta^{13}C$	Female	t5	2	22.6 ± 18.5	3.49	142	0.35	6.3	145	0.26	3	0.088 **	0.012	ns	no
(normalized)			4	94 ± 9	9.13	142	-0.51	15.6	146	-0.52	12.7	0.000 ***	0.000	ns	no
			9	59.2 ± 22.1	4	153	0.3	4.6	157	0.34	5	0.048 ***	0.001	ns	no
	Male	t5	11	54.8 ± 6.41	13.44	161	0.65	22.3	165	0.49	11.2	0.000 ***	0.000	ns	no
Foliar $\Delta^{13}C$	Male	t5	2	62.8 ± 33.7	3.58	129	-0.32	2.2	125	-0.67	6.2	0.027 ***	0.045 ***	ns	no
(normalized)			8	13.1 ± 16.1	6.52	127	-0.52	5.8	123	-0.81	9.3	0.001 ***	0.000 ***	ns	no
			11	66.9 ± 8.77	11.17	136	1.003	20.7	135	1.1	17.5	0.000 ***	0.000 ***	ns	no
SLA	Female	t5	2	52 ± 13.3	2.92	164	14.88	7.9	162	3.6	0.4	0.115 *	0.088 **	ns	no
	Male	t2	11	56 ± 7.55	9.49	153	-15.82	11.1	153	-21.19	14.8	0.000 ***	0.000 ***	ns	no
		t5	3	43.6 ± 13.5	2.84	159	-1.38	1.3	157	-3.42	8.5	0.029 ***	0.432	0.012 ***	yes
Total Dry Weight	Male	t5	2	44.4 ± 12.2	3.38	149	0.41	3.9	148	0.47	5.9	0.000 ***	0.000 ***	ns	no
(normalized)			12	18 ± 9.59	3.25	89	0.72	13	87	0.39	4.9	0.015 ***	0.015 ***	ns	no
Stem Dry Weight	Female	t5	12	47.4 ± 7.46	3.11	141	-0.45	5.1	141	-0.43	4.9	0.087 **	0.000 ***	ns	no
(normalized)	Male	t5	2	45.1 ± 16.8	3.09	149	0.41	3.9	148	0.42	4.7	0.104 *	0.000 ***	ns	no
Stem Diameter	Male	t0	12	12.9 ± 7.55	3.11	90	0.6	10.9	90	0.39	5.3	0.057 **	0.029 ***	ns	no
(normalized)		t5	12	15.9 ± 9.4	3.36	90	0.72	13.8	88	0.26	2.3	0.043 ***	0.057 **	0.02 ***	yes
Stem Height	Female	t0	4	21.3 ± 10.7	4.16	145	-0.36	3.4	144	-0.55	9	0.144 *	0.000 ***	ns	no
(normalized)			12	48.8 ± 4.64	3.54	142	-0.58	9.3	141	-0.24	1.5	0.087 **	0.000 ***	ns	no

Table 6 Results of the QTLs detection using Composite Interval Mapping of the MultiQTL software coupled to the MultiEnvironment function, relative to foliar characteristics, $\Delta^{13}C$ and growth traits. Presented data show the parental genetic **Map** used for QTL detection, the **LG** (Linkage Group), **Loci** (cM; LOD score peak position from the top of the linkage group ± standard deviation calculated using boostrap test), **LOD, n** (number of full-sibs with available

data used for QTL detection), **Effect** (estimated effect of the presence of the QTL on quantitative response), **PEV** (Percentage of Explained Variance), $\mathbf{p_{gen}}$ (probability at the genome level of the standard model; *Significant QTL* : *** $p<0.05$; *Putative QTLs*: ** $0.05<p<0.1$, * $0.1<p<0.15$, + $0.15<p<0.2$), $\mathbf{p_{gen,EE}}$ (probability at the genome level of the Equivalent Effects model), $\mathbf{p_{mod}}$ (significance of the difference between models), **CO_2 effect** (presence or absence of QTL related to quantitative trait response to $[CO_2]$).

Figure legends

Figure 1 a,b,c Effects of elevated [CO_2] on gas exchange of young oaks (means $\pm$ *se*) at five growing steps (*Flush 1* : t1 = julian day 149*; Flush 2* : t2 = julian day 177; *Flush 3* : t3 = julian day 204, t4 = julian day 234, t5 = julian day 271). **a**: net CO_2 assimilation (µmol m^{-2} s^{-1}); **b**: stomatal conductance to water (mol m^{-2} s^{-1}); **c**: ratio An/g_w (calculated intrinsic Water Use Efficiency WUEi). Bars with small letters show significant differences (ANOVA and t-test for dependant samples, $p < 0.05$).

Figure 2 Frequencies distribution of full-sib oaks grown at ambient (380 vpm) or elevated (680 vpm) [CO_2] relatively to measured stomatal conductance to water vapour g_w (mol m^{-2} s^{-1}), net CO_2 assimilation A_n (µmol m^{-2} s^{-1}) and An/g_w ratio (WUEi) on leaves at five growing steps (Flush 1: t1 = julian day 149; Flush 2: t2 = julian day 177; Flush 3: t3 = julian day 204, t4 = julian day 234, t5 = julian day 271).

Figure 3 a, b Isotopic discrimination against ^{13}C ($\Delta^{13}C$; ‰) measured on leaves or wood cellulose at ambient (380 vpm) or elevated (680 vpm) [CO_2] at the end of the growing season (t5, julian day 271). **a:** Correlation between $\Delta^{13}C$ (‰) measured on wood cellulose compared to leaves. **b:** Correlation between $\Delta^{13}C$ (‰) measured on trees grown at 680 vpm compared to 380 vpm [CO_2].

Figure 4 Location of the significant QTLs detected for growth, gas exchanges, leaf properties and isotopic discrimination on the genetic map of Quercus robur. Linkage Groups (**LG**) are identified by their rank and their relation to the parental maps (F=Female or M=Male). The letter **R** design linkage groups of which markers position have been reversed and recalculated for an easier comparison of parental maps. Each QTL is represented by a central bar defined by the two positions of the highest LOD score obtained by using Composite Interval Mapping and the boostrap analysis) and lines which give the Confidence intervals determined by the boostrap analysis. QTLs detected using standard and multienvironment analysis were

represented using respectively grey and black bars. Same markers on both female and male maps were highlighted on linkage groups.

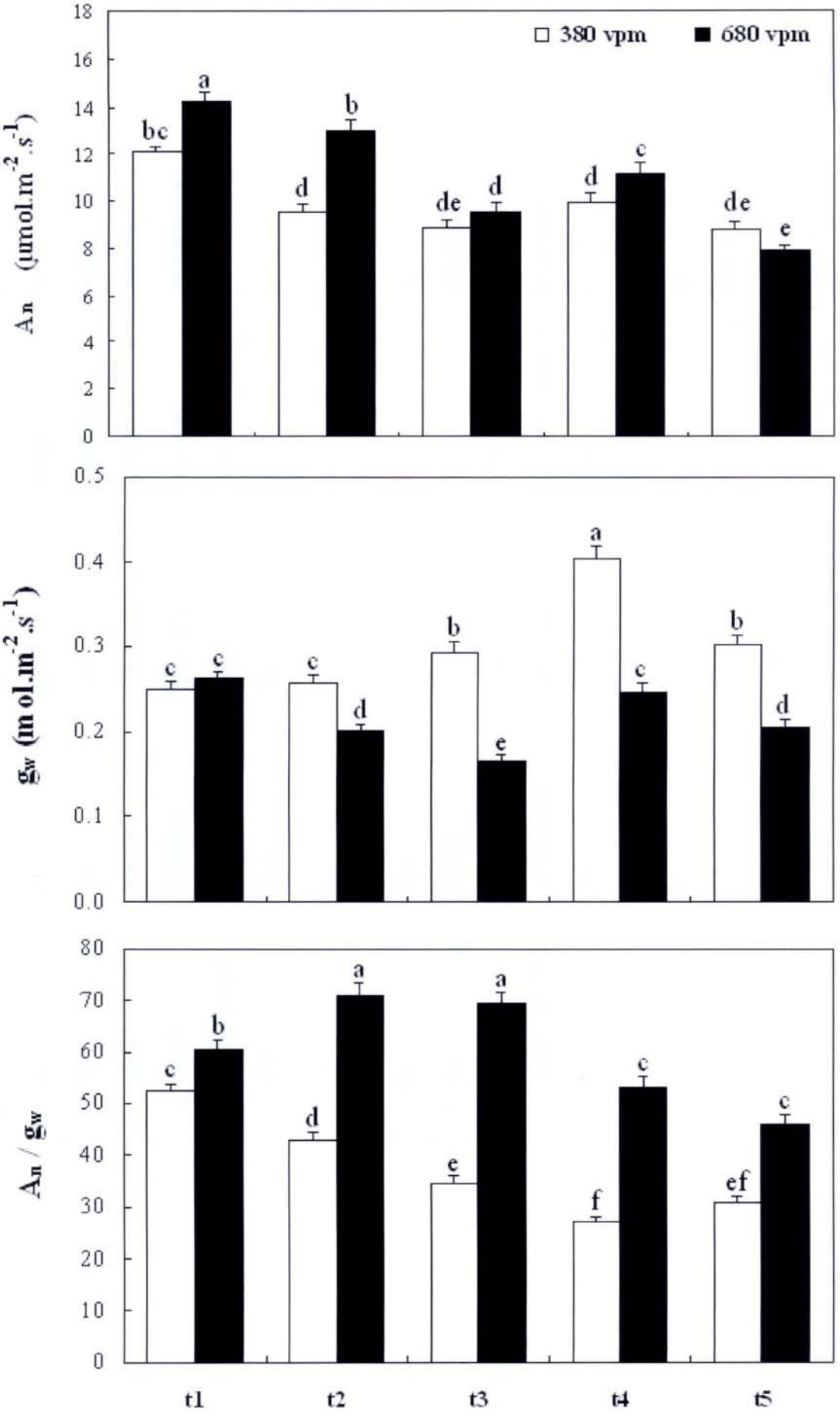


Figure 1 a,b,c

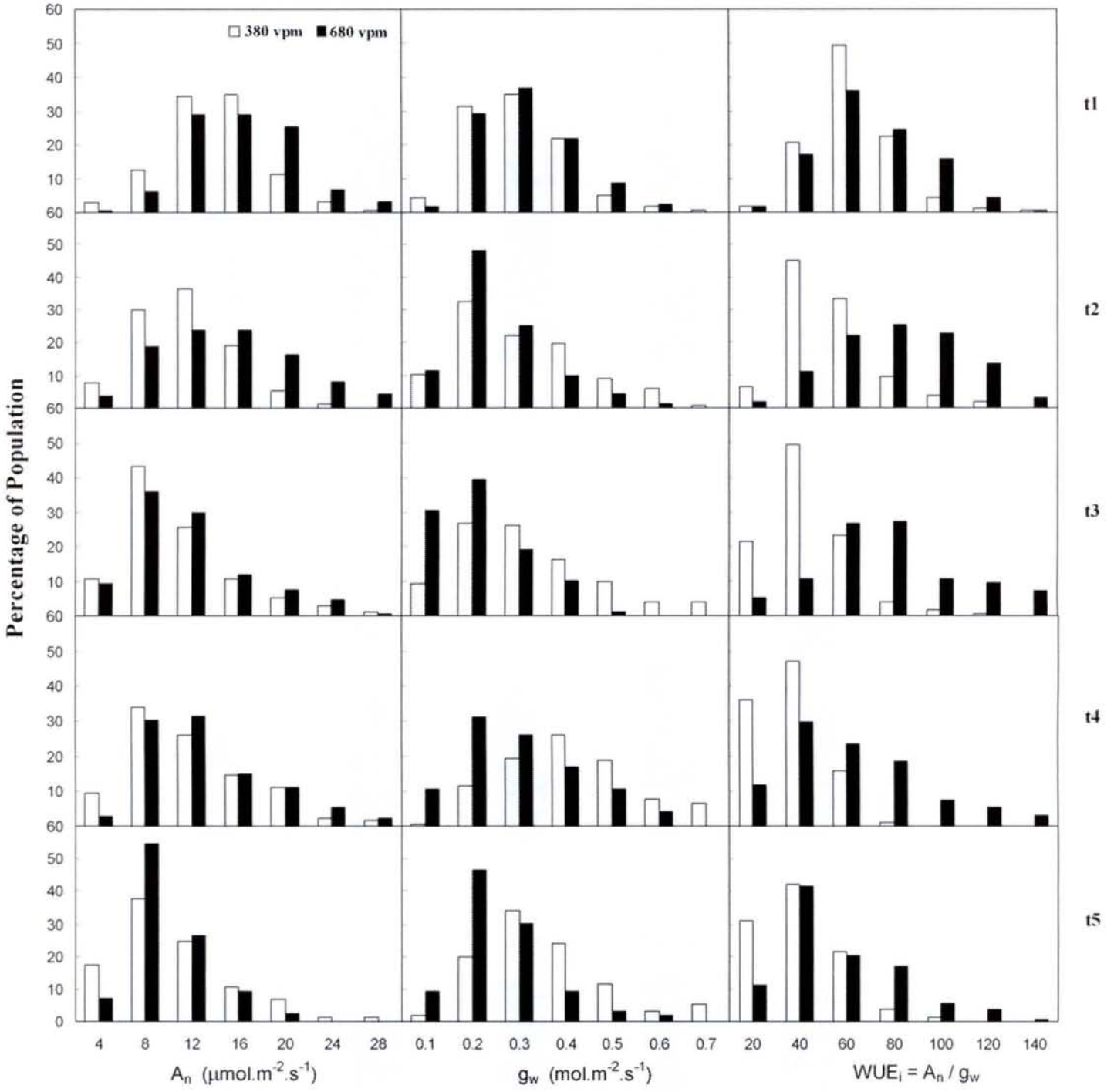

□ 380 vpm ■ 680 vpm
t1
t2
t3
t4
t5
Percentage of Population
A_n (μmol.m^{-2}.s^{-1})
g_w (mol.m^{-2}.s^{-1})
$WUE_i = A_n / g_w$

Figure 2

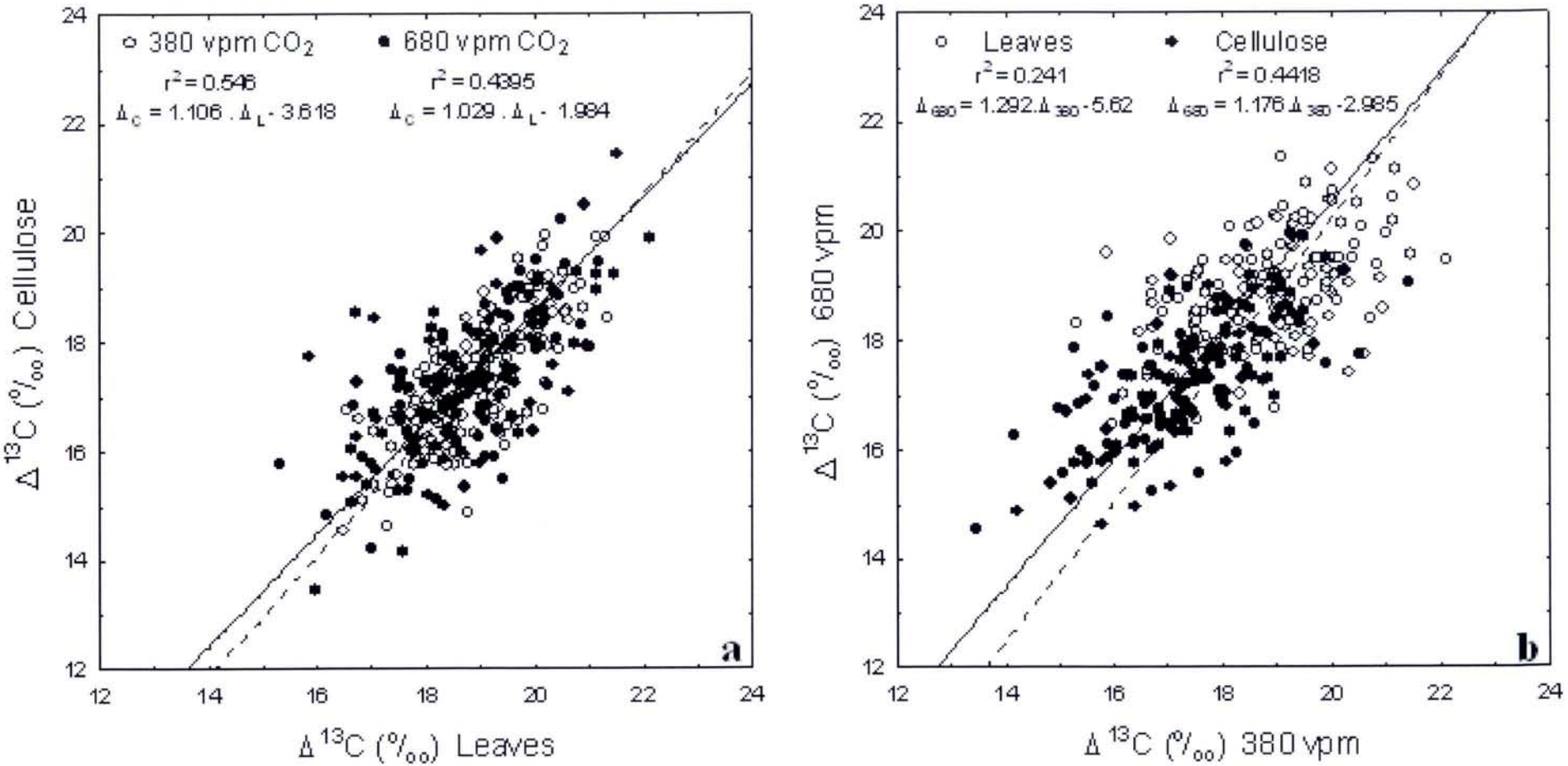

380 vpm CO2
680 vpm CO2
r2 = 0.546
r2 = 0.4395
Δc = 1.106 . ΔL - 3.618
Δc = 1.029 . ΔL - 1.984
Δ 13C (‰) Cellulose
Δ 13C (‰) Leaves
a
Leaves
Cellulose
r2 = 0.241
r2 = 0.4418
Δ680 = 1.292.Δ380 - 5.62
Δ680 = 1.176 Δ380 -2.985
Δ 13C (‰) 680 vpm
Δ 13C (‰) 380 vpm
b

Figure 3 a, b

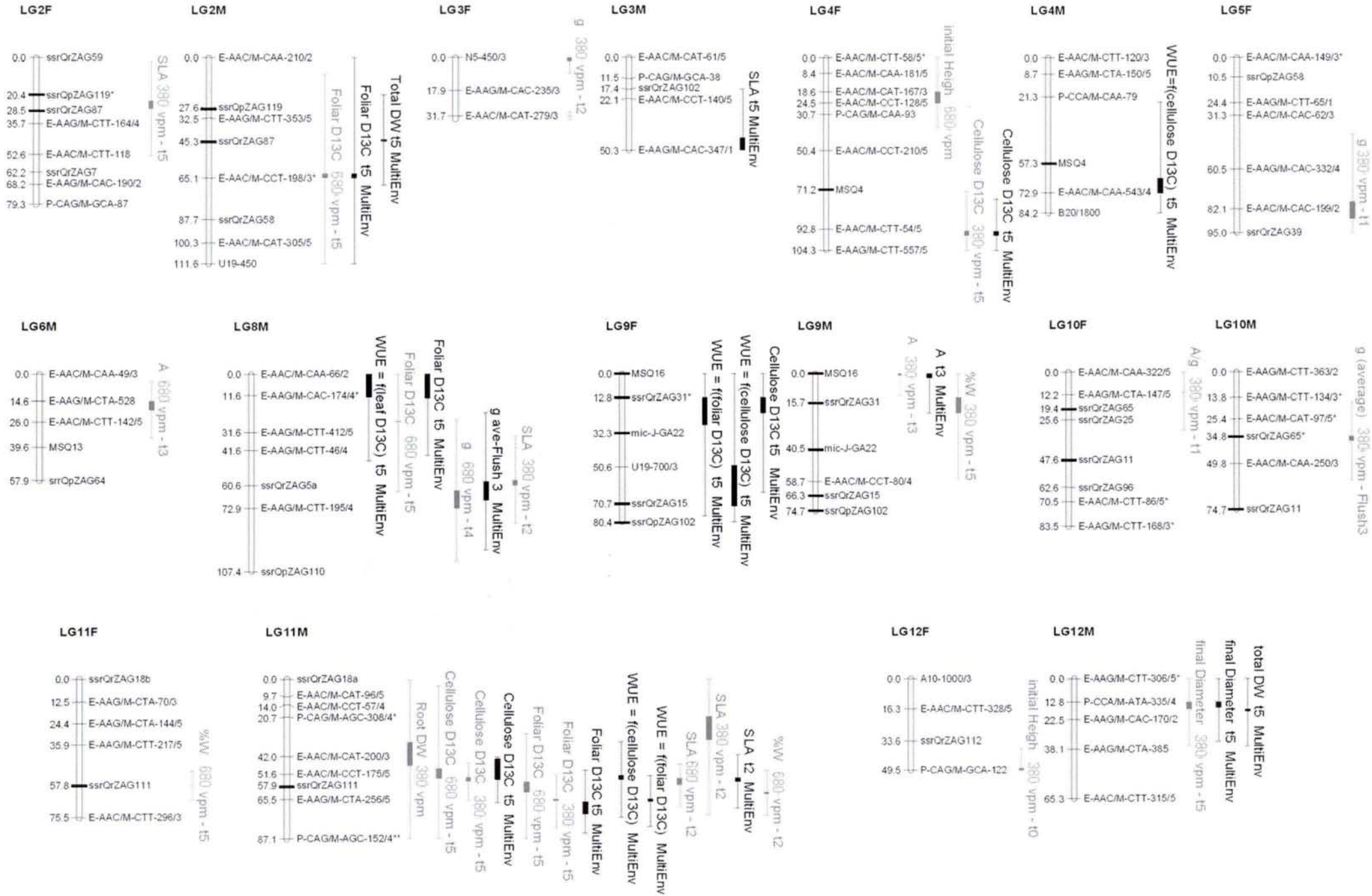

LG2F
0.0 ssrQrZAG59
20.4 ssrQpZAG119*
28.5 ssrQrZAG87
35.7 E-AAG/M-CTT-164/4
52.6 E-AAC/M-CTT-118
62.2 ssrQrZAG7
68.2 E-AAG/M-CAC-190/2
79.3 P-CAG/M-GCA-87
SLA 380 vpm - t5
LG2M
0.0 E-AAC/M-CAA-210/2
27.6 ssrQpZAG119
32.5 E-AAG/M-CTT-353/5
45.3 ssrQrZAG87
65.1 E-AAC/M-CCT-198/3*
87.7 ssrQrZAG58
100.3 E-AAC/M-CAT-305/5
111.6 U19-450
Foliar D13C 680 vpm - t5
Foliar D13C t5 MultiEnv
Total DW t5 MultiEnv
LG3F
0.0 N5-450/3
17.9 E-AAG/M-CAC-235/3
31.7 E-AAC/M-CAT-279/3
g 380 vpm - t2
LG3M
0.0 E-AAC/M-CAT-61/5
11.5 P-CAG/M-GCA-38
17.4 ssrQrZAG102
22.1 E-AAC/M-CCT-140/5
50.3 E-AAG/M-CAC-347/1
SLA t5 MultiEnv
LG4F
0.0 E-AAC/M-CTT-58/5*
8.4 E-AAC/M-CAA-181/5
18.6 E-AAC/M-CAT-167/3
24.5 E-AAC/M-CCT-128/5
30.7 P-CAG/M-CAA-93
50.4 E-AAC/M-CCT-210/5
71.2 MSQ4
92.8 E-AAC/M-CTT-54/5
104.3 E-AAG/M-CTT-557/5
Initial Heigh 680 vpm
Cellulose D13C 380 vpm - t5
LG4M
0.0 E-AAC/M-CTT-120/3
8.7 E-AAG/M-CTA-150/5
21.3 P-CCA/M-CAA-79
57.3 MSQ4
72.9 E-AAC/M-CAA-543/4
84.2 B20/1800
Cellulose D13C t5 MultiEnv
WUE=f(cellulose D13C) t5 MultiEnv
LG5F
0.0 E-AAC/M-CAA-149/3*
10.5 ssrQpZAG58
24.4 E-AAG/M-CTT-65/1
31.3 E-AAC/M-CAC-62/3
60.5 E-AAG/M-CAC-332/4
82.1 E-AAC/M-CAC-199/2
95.0 ssrQrZAG39
g 380 vpm - t1
LG6M
0.0 E-AAC/M-CAA-49/3
14.6 E-AAG/M-CTA-528
26.0 E-AAC/M-CTT-142/5
39.6 MSQ13
57.9 srrQpZAG64
A 680 vpm - t3
LG8M
0.0 E-AAC/M-CAA-66/2
11.6 E-AAG/M-CAC-174/4*
31.6 E-AAG/M-CTT-412/5
41.6 E-AAG/M-CTT-46/4
60.6 ssrQrZAG5a
72.9 E-AAG/M-CTT-195/4
107.4 ssrQpZAG110
Foliar D13C 680 vpm - t5
Foliar D13C t5 MultiEnv
WUE = f(leaf D13C) t5 MultiEnv
g 680 vpm - t4
g ave-Flush 3 MultiEnv
SLA 380 vpm - t2
LG9F
0.0 MSQ16
12.8 ssrQrZAG31*
32.3 mic-J-GA22
50.6 U19-700/3
70.7 ssrQrZAG15
80.4 ssrQpZAG102
WUE = f(foliar D13C) t5 MultiEnv
WUE = f(cellulose D13C) t5 MultiEnv
Cellulose D13C t5 MultiEnv
LG9M
0.0 MSQ16
15.7 ssrQrZAG31
40.5 mic-J-GA22
58.7 E-AAC/M-CCT-80/4
66.3 ssrQrZAG15
74.7 ssrQpZAG102
A t3 MultiEnv
A 380 vpm - t3
%W 380 vpm - t5
LG10F
0.0 E-AAC/M-CAA-322/5
12.2 E-AAG/M-CTA-147/5
19.4 ssrQrZAG65
25.6 ssrQrZAG25
47.6 ssrQrZAG11
62.6 ssrQrZAG96
70.5 E-AAC/M-CTT-86/5*
83.5 E-AAG/M-CTT-168/3*
LG10M
0.0 E-AAG/M-CTT-363/2
13.8 E-AAG/M-CTT-134/3*
25.4 E-AAC/M-CAT-97/5*
34.8 ssrQrZAG65*
49.8 E-AAC/M-CAA-250/3
74.7 ssrQrZAG11
A/g 380 vpm - t1
g (average) 380 vpm - Flush3
LG11F
0.0 ssrQrZAG18b
12.5 E-AAG/M-CTA-70/3
24.4 E-AAG/M-CTA-144/5
35.9 E-AAG/M-CTT-217/5
57.8 ssrQrZAG111
75.5 E-AAC/M-CTT-296/3
%W 680 vpm - t5
LG11M
0.0 ssrQrZAG18a
9.7 E-AAC/M-CAT-96/5
14.0 E-AAC/M-CCT-57/4
20.7 P-CAG/M-AGC-308/4*
42.0 E-AAC/M-CAT-200/3
51.6 E-AAC/M-CCT-175/5
57.9 ssrQrZAG111
65.5 E-AAG/M-CTA-256/5
87.1 P-CAG/M-AGC-152/4**
Root DW 380 vpm
Cellulose D13C 680 vpm - t5
Cellulose D13C 380 vpm - t5
Cellulose D13C t5 MultiEnv
Foliar D13C 680 vpm - t5
Foliar D13C 380 vpm - t5
Foliar D13C t5 MultiEnv
WUE = f(cellulose D13C) MultiEnv
WUE = f(foliar D13C) MultiEnv
SLA 380 vpm - t2
SLA 680 vpm - t2
SLA t2 MultiEnv
%W 680 vpm - t2
LG12F
0.0 A10-1000/3
16.3 E-AAC/M-CTT-328/5
33.6 ssrQrZAG112
49.5 P-CAG/M-GCA-122
LG12M
0.0 E-AAG/M-CTT-306/5*
12.8 P-CCA/M-ATA-335/4
22.5 E-AAG/M-CAC-170/2
38.1 E-AAG/M-CTA-385
65.3 E-AAC/M-CTT-315/5
Initial Heigh 380 vpm - t0
final Diameter 380 vpm - t5
final Diameter t5 MultiEnv
total DW t5 MultiEnv

Figure 4

Madame **TORTI – MARCY Xavière**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°1122

Nancy, le 21 Novembre 2005

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 * LE PRÉSIDENT

J.P. FINANCE

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

RESUME

Dans le cadre de l'élévation de la concentration atmosphérique en CO_2 ($[CO_2]$) dans l'atmosphère, nous avons abordé la réponse des arbres à ce changement en utilisant simultanément plusieurs approches, de l'échelle du plant entier à l'échelle du génome. Pour cela, 183 chênes pédonculés issus d'une famille de plein-frères ont été exposés durant une saison de végétation à 380 ou 680 vpm de $[CO_2]$ dans des serres localisées à Nancy (France), avec une fertilisation et une irrigation optimales. Des mesures d'échanges gazeux et de croissance ont été effectués à différentes dates durant l'expérience, ainsi que des prélèvements de feuilles sur les $2^{ème}$ et $3^{ème}$ pousses foliaires. Sur ces feuilles, des dosages biochimiques ont été effectués afin de déterminer la répartition de l'azote dans le système photosynthétique. Des mesures d'activités enzymatiques relatives au métabolisme carboné primaire ont également été réalisées. En addition à ces analyses, des mesures de discrimination isotopique contre le ^{13}C ont été effectuées sur les feuilles et la cellulose du bois. Les différentes analyses ont révélé une stimulation globale de la croissance des individus sous fort $[CO_2]$, associée à une meilleure efficience d'utilisation de l'eau (WUE) liée majoritairement à une diminution de la conductance stomatique. La photosynthèse est stimulée transitoirement grâce à la forte pression partielle en CO_2 dans les feuilles, bien que l'azote présent dans les différents composants du système photosynthétique (collecte lumineuse ou assimilation carbonée) soit clairement redirigé vers d'autres processus physiologiques. La photorespiration est progressivement réduite sous fort $[CO_2]$. Une recherche de Quantitative Trait Loci (QTLs) a été effectuée à partir de ces données et de la carte génétique des chênes parents de la famille étudiée. La grande variabilité phénotypique observée dans les différentes analyses a permis de détecter plusieurs zones du génome intéressantes par le nombre important de QTLs qui y sont associés, pourtant liés à des caractères différents. De plus, certains de ces QTLs avaient déjà été trouvés dans d'autres expériences sur la même famille, en particulier concernant la discrimination isotopique. Enfin, plusieurs QTLs ont été caractérisés par leur réponse spécifique à la variation de $[CO_2]$ atmosphérique. Une telle approche représente une nouveauté dans le domaine de la biologie intégrative et dans la recherche génétique, et les premiers résultats obtenus présagent de grandes potentialités quant à la continuation de telles expérimentations.

Mots-clefs : *Quercus robur* L., $[CO_2]$ élevé, croissance, photosynthèse, conductance stomatique, photorespiration, efficience d'utilisation en eau WUE, discrimination isotopique $\Delta^{13}C$, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, QTLs.

SUMMARY

In the context of the elevation of CO_2 concentration ($[CO_2]$) on atmosphere, we studied the tree responses to this changing using simultaneously several approaches, from the all tree to the genome level. For this, 183 pedunculate oaks from a full-sib family were exposed during one growing season to 380 or 680 vpm $[CO_2]$ in glasshouses localised in Nancy (France), and were correctly fertilised and irrigated. Gas exchange and growth measurements were made at several dates of the experiment, together with foliar samplings on the second and third flushes. On the collected leaves, biochemical measurements were done to determine the nitrogen distribution within the photosynthetic system. Enzymatic activities related to the primary carbon metabolism were also determined. In addition, measurements of isotopic discrimination against ^{13}C were made on leaves and wood cellulose. The different conducted analysis showed a general stimulation of the trees growth under elevated $[CO_2]$, in association with higher water use efficiency (WUE) linked for the most part to a lowered stomatal conductance. Photosynthesis is stimulated for a moment due to a higher $[CO_2]$ partial pressure on leaves, although the nitrogen that composed the photosynthetic apparatus (for light harvesting and carbon assimilation) is clearly redirected to other physiological processes. Photorespiration is progressively reduced under elevated $[CO_2]$. Quantitative Trait Loci (QTLs) research was conducted using these data and the genetic maps of the parental oaks of the studied family. The large phenotypical variability allowed the detection of several genome regions of special interest due to the large number of detected QTLs localised on them, although associated with different characters. Furthermore, some of the obtained QTLs had yet been detected in other experiments conducted on the same family, in particular for the isotopic discrimination. Lastly, several QTLs showed a significant response to the $[CO_2]$ variation on atmosphere. Such an approach is new in integrative biology and genetic research, and first results suggest great opportunities by continuing such experiments.

Key-Words : *Quercus robur* L., elevated $[CO_2]$, growth, photosynthesis, stomatal conductance, photorespiration, water use efficiency WUE, isotopic discrimination $\Delta^{13}C$, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, QTLs.