



**HAL**  
open science

# Réponses du peuplier soumis à une combinaison de contraintes, ozone et sécheresse : dynamique de la conductance stomatique et des capacités antioxydantes foliaires

Nicolas Dusart

## ► To cite this version:

Nicolas Dusart. Réponses du peuplier soumis à une combinaison de contraintes, ozone et sécheresse : dynamique de la conductance stomatique et des capacités antioxydantes foliaires. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0070 . tel-02331001

**HAL Id: tel-02331001**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02331001>**

Submitted on 24 Oct 2019

**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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Ecole Doctorale SIReNa (Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles)

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**  
Mention : « Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes »

**Nicolas DUSART**

# **Réponses du peuplier soumis à une combinaison de contraintes, ozone et sécheresse : dynamique de la conductance stomatique et des capacités antioxydantes foliaires**

Soutenue publiquement le 23 juillet 2019

### Membres du jury :

#### **Rapporteurs :**

Madame Anne REPELLIN Professeure

Université Paris-Est Créteil, iEES Paris,  
Créteil

Monsieur Stéphane HERBETTE  
Maître de conférences

UMR PIAF, Université Clermont Auvergne,  
Clermont-ferrand

#### **Examineurs :**

Mr Jean-François CASTELL  
Maître de conférences

UMR ECOSYS, Centre Agroparistech,  
Grignon

Monsieur Nicolas ROUHIER Professeur

UMR I.A.M., Université de Lorraine, Nancy

#### **Directeur de thèse :**

Monsieur Yves JOLIVET Professeur

UMR Silva, Université de Lorraine, Nancy

#### **Co-directeur de thèse :**

Madame Marie-Noëlle VAULTIER  
Maître de conférences

UMR Silva, Université de Lorraine, Nancy

#### **Membre invité :**

Monsieur Didier LE THIEC  
Directeur de Recherche

UMR Silva, INRA, Champenoux





# Remerciements

---

Cette thèse est une aventure de quatre ans qui n'aurait pas eu lieu sans le soutien de beaucoup de personnes. C'est avec plaisir que je remercie celles et ceux sans qui ce travail aurait sûrement été différent.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes encadrants pour la confiance qu'ils ont eue en moi.

Merci à Yves Jolivet pour sa bienveillance et sa disponibilité permanente.

Merci à Marie-Noëlle Vaultier pour son écoute et sa bonne humeur.

Merci à Didier le Thiec qui m'a appris deux choses essentielles : l'affirmation de soi et les échanges gazeux.

Je remercie également Anne Repellin et Stéphane Herbette pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de recherche.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Jean-François Castell, Eric Ruelland et Nicolas Rouhier, pour leur écoute et leur soutien.

Je tiens à remercier tout particulièrement le professeur émérite Pierre Dizengremel d'avoir partagé sa passion pour la science. Nos discussions du jeudi me manqueront.

Ma thèse aurait été terriblement compliquée sans l'aide de Joëlle Gérard. Merci d'avoir pris du temps à la paillasse, tu es irremplaçable. Profite de ta retraite !

Un grand merci également à Sandrine Chauchard pour les discussions sur les statistiques.

J'adresse ma gratitude à Stéphane Martin, Jean Charles Olry, Cyril Buré, Christelle Colignon et Tiphaine Dhalleine pour l'aide technique apportée lors des différentes expérimentations et l'acquisition des données.

Merci à mes stagiaires, Caroline Polo, Melvin Moreaux et Marie Colette.

Par souci de concision, je n'énumérerai pas tous les membres du laboratoire. Je m'en excuse, mais je sais que vous me pardonnerez parce que vous êtes tous géniaux !

Mention spéciale aux doctorants qui sont passés avant moi, Maxime B., PAC, Estelle, Laura, Yoran, et à ceux qui passeront après moi, Maxime D. (c'est pour bientôt), Benjamin et Nicolas.

Enfin, Aline, sans ton soutien indéfectible pendant ces quatre ans – et tes relectures –, je pense que cette thèse n'aurait clairement pas vu le jour. Maintenant qu'elle est terminée, nous allons bientôt pouvoir nous envoler vers de nouveaux horizons !

J'allais oublier ! Ce travail a nécessité la torture de 448 peupliers qui ont donné leur vie à la science et une certaine quantité de plastique : un esprit fatigué, alimenté par au moins 1 095 L de café, l'estime de manière totalement arbitraire à 2 498 tubes, 6 666 cônes et un certain nombre de microplaques.

# Origine des financements et valorisation scientifique

Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans de multiples sources de financement. En effet, mon contrat doctoral a été financé par le Ministère de l'Enseignement et de la Recherche (2015-2018) et ma thèse a bénéficié du soutien de l'Agence Nationale de la Recherche à travers le Laboratoire d'excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01) à travers l'obtention du projet DETPOP en 2012-2014. Ce projet a permis d'initier la première expérimentation de thèse durant mon master 2. Mes travaux de recherche ont également bénéficié d'un financement de la structure de recherche fédérative EFABA en 2016 (projet JASMO-DETOX). Ce deuxième projet a rendu possible une collaboration internationale avec le Laboratory of Hormonal Regulations in Plants, Prague, (République Tchèque). Durant ma thèse, j'ai également eu la possibilité d'exercer des missions d'enseignement, de la licence au master, entre 2016 et 2018, en tant que doctorant contractuel chargé d'enseignement. La quatrième année de doctorat a été permise grâce à l'obtention d'un contrat d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à mi-temps.

## Articles scientifiques

**Dusart, N.,** Gérard, J., Le Thiec, D., Collignon, C., Jolivet, Y., Vaultier, M.-N., 2019. *Integrated analysis of the detoxification responses of two Euramerican poplar genotypes exposed to ozone and water deficit: Focus on the ascorbate-glutathione cycle.* Science of The Total Environment, 651, 2365-2379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.367>

Pellegrini E., Hoshika Y., **Dusart N.**, Cotrozzi L., Gérard J., Nali C., Vaultier M.-N., Jolivet Y., Lorenzini G., Paoletti E., 2019. *Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions,* Science of The Total Environnement, 647, 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.413>

**Dusart N.,** Vaultier M.-N., Olry J.-C., Buré C., Gérard J., Jolivet Y., Le Thiec D., 2019. *Altered stomatal dynamics of two Euramerican poplar genotypes submitted to successive ozone exposure and water deficit,* Environnemental Pollution, 252, 1687-1697.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.110>

**Dusart N.,** Gandin A., Vaultier M.-N., Joffe R., Cabané M., Dizengremel P., Jolivet Y., 2019. *Importance of detoxification processes in ozone risk assessment: need to integrate the cellular compartmentation of antioxidants into foliar organs? Frontiers in Forests and Global Change,* 2, 45. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00045>

## **Communications Orales**

**Mai 2018**, Florence: Ozone Plant Conference

« Poplar submitted to a succession of ozone and drought stresses: dynamic of stomatal responses »

**Juin 2017**, Nancy : journée des doctorants et post-doctorants de l'UMR EEF

« Dynamique de réponse des stomates chez le Peuplier soumis aux contraintes ozone et sécheresse »

**Juillet 2016**, Nancy : journée des doctorants et post-doctorants de l'UMR EEF

« Réponse du peuplier face à deux contraintes abiotiques : Quel lien entre la voie de signalisation des jasmonates et les processus de détoxification ? »

## **Posters**

**Mai 2018**, Florence: Ozone plant conference

«Poplar exposed to ozone and drought: focus on ascorbate-glutathione cycle »

**September 2017**, Fribourg: IUFRO 125th anniversary

« Antioxidant capacity of poplar exposed to ozone and drought »

**Octobre 2015**, Nancy: INUPRAG – INRA/UPSC meeting

« Responses of poplar to a combination of ozone and drought »

## **Valorisation grand public**

**2016** : Réalisation d'un atelier de vulgarisation de ma thèse à destination de classes de primaires (CM1/CM2) dans le cadre d'une formation « Experimentarium »

**2017** : Organisation et animation d'un stand sur les thématiques du laboratoire pour la fête de la science

# Liste des abréviations

---

9OH-ABA	9-hydroxy-ABA
A <sub>n</sub>	Assimilation nette pour le CO <sub>2</sub>
AA	Air Ambient
ABA	Acide abscissique (ABscisic Acid)
ACC	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ACI	Anthocyane Content Index
ACP	Analyse en Composante Principale
ACS	Accelerated Cell Senescence
ADNc	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AFOCEL	Association FORêt-CELLulose
AFstY	Accumulated stomatal flux above a threshold of Y nmol m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>
ANCOVA	Analyse de la covariance
ANOVA	Analyse de la variance
Anth	Anthocyanes
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique
AsA	Ascorbate, acide ascorbique, vitamine C
BWB (modèle)	modèle Ball-Woodward-Berry
BzA	Acide benzoïque
Car	Caroténoïde
CAT(s)	Catalase(s)
CCI	Chlorophylles Content Index
CH <sub>4</sub>	Méthane
Chl	Chlorophylles
CK(s)	Cytokinine(s)
CLRTAP	Convention on land range and transboundary air pollution
COI1	Coronatine-insensitive protein 1
ct	Crossing threshold
CUO	Cumulative Ozone Uptake
cZ7G	cis-zeatin-7-glucoside
cZOG	cis-zeatin-O-glucoside
cZOX	cis-zeatin-O-xyloside
cZR	cis-zeatin riboside
cZRMP	cis-zeatin riboside monophosphate
cZROG	cis-zeatin riboside -O-glucoside
D	Water Deficit/Drought
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DHAR	Déhydroascorbate réductase
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphate
DPA	Acide dihydrophaseique
DTNB	Acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry Weight
DZOG	Dihydrozeatin-O-glucoside
DZR	Dihydrozeatin riboside
DZROG	Dihydrozeatin riboside -O-glucoside
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
EPA	Agence de Protection environnementale (US)
ET	Ethylène
FA	Filtered air parfois abrégé AF pour air filtré

FACE	Free-air concentration enrichment
Flav	Flavonols
FW	Fresh Weight
GNT	Genotype
GR	Glutathione Reductase
gs	Conductance stomatique à la vapeur d'eau
GSH	Glutathion ("forme réduite")
GSSG	Glutathion disulfide ("forme oxydée")
gw	Conductance stomatique à la vapeur d'eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAF (cycle)	Cycle ascorbate-glutathion nommé cycle Halliwell-Asada-Foyer
HMBPP	4-hydroxy-3- methyl-2-(E)-butenyl diphosphate
HO	Radical hydroxyle
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IAA-Asp	IAA-aspartate
IAs	acide indole-acétique et auxine(s)
ICP forêt	International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests
ICS	l'Ischorismate Synthase
iP	isopentenyl adénine
iP7G	N6-isopentenyladenosine-7-glucoside
iP7G	isopentenyl adénine-7-glucoside
iP9G	N6-isopentenyladenosine-9-glucoside
IPA	acide indol-3-ylpyruvique
iPR	N6-isopentenyladénosine
iPR	isopentenyl adénosine
iPRDP	N6-isopentenyladénosine-50-diphosphate
iPRMP	N6-isopentenyladénosine-50-monophosphate
iPRMP	isopentenyl adenosine monophosphate
iPRTP	N6-isopentenyladenosine-50-triphosphate
IPT	isopentyl transférase
IRGA	analyseur de gaz à infrarouge
JA(s)	Jasmonate (et ses dérivés)
JA-ILE	JA-isoleucine
JAZ	jasmonate-zim-domain protein
KI	iodure de potassium
l'AOT 40	accumulated dose over a threshold of 40ppb
LOX	lipoxygénase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MD	moderate drought
MDA	malondialdehyde
MDAR	monoascorbate reductase
MDHAR	monodéhydroascorbate réductase
MF	masse fraîche
MS	masse sèche
NAD(P)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
NCED	9-cis-epoxycaroténoïde dioxygénases
NCLAN	The National Crop Loss Assessment Network
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
NOx	Oxydes d'azote
NPR1	Nonexpressor of Pathogenesis Related 1
O <sub>3</sub>	ozone par extension l'ozone troposphérique
OxIAA	Acide oxindole-3-acétique
OxIAA-GE	oxo-IAA-glucose ester

PA	Phaseic acid
PAA	Phenylacetic acid
PAD4	Phytoalexin Deficient4
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase
PAR	Rayonnement photosynthétiquement actif (Photosynthetically Active Radiation)
PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PCD	Programmed Cell Death
PODy	Phytotoxic Ozone Dose above a treshold of $y \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
PP2C	Protéine Phospatase 2C
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
REW	Relative Extractable soil Water
ROS	Reactive Oxygene Species
RT-PCR	Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SA	Acide salicylique
SCFCOII	F-box protein Coronatine insentive 1
SD	Severe Drought
Slmax	Slope Maximum, la pente maximum
SOD	Superoxide dismutase
SUM	Sum of all hourly average concentrations over $X \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$
SWC	Soil volumetric Water Content
TAC	Total antioxidant capacity
TCA	Acide trichloracétique
TDR	Time domain reflectometry
TNB	Acide 2-Nitro-5-thiobenzoïque
tZ	trans-zeatin
tZ9G	trans-zeatin-9-glucoside
tZOG	trans-zeatin-O-glucoside
tZOG	trans-zeatin-O-glucoside
tZOX	trans-zeatin-O-xyloside
tZR	trans-zeatin riboside
tZRMP	trans-zeatin riboside monophosphate
tZROG	trans-zeatin-Oglucoside riboside
tZROG	trans-zeatin riboside -O-glucoside
UV	Ultra-violet
VAZ	Violaxanthine, Anthéranthine, Zéaxanthine (cycle)
VPD	Déficit de pression de vapeur d'eau
WUEi	Efficiencie intrinsèque d'utilisation de l'eau
WW	Well Watered (bien hydratée)

# Liste des figures

---

Figure 1 : Concept général décrivant les différentes phases de réponse des plantes à un stress.....	2
Figure 2 : Mécanismes simplifiés de la formation photochimique de l’ozone (Lightfoot et al., 1992). .....	6
Figure 3 : Traversée (de gauche à droite) schématique d'une agglomération par une masse d'air transportée par le vent. ....	8
Figure 4 : Méta-analyse de l’effet de l’O <sub>3</sub> sur des paramètres de croissance .....	12
Figure 5 : Formation et propriétés des principaux ROS. ....	14
Figure 6 : Concept de la formation des ROS sous sécheresse (Noctor et al., 2014). ....	16
Figure 7 : Effet de concentrations élevées d’ozone [O <sub>3</sub> ] (eO <sub>3</sub> ) sur des mécanismes antioxydants des arbres (Li et al., 2017). ....	18
Figure 8 : Effet taille (hedges’s g) et intervalles de confiance 95% de la réponse d’antioxydants non enzymatiques foliaires et de leur statut redox sous déficit hydrique.....	18
Figure 9 : Cycle Halliwell-Asada-Foyer (HAF) ou cycle ascorbate-glutathion. ....	20
Figure 10 : Représentation schématique des voies de signalisation les mieux décrites activées sous ozone lors d’un stress oxydant (adapté de Baier et al., 2005).....	21
Figure 11 : Schéma présentant la synthèse, l’interconversion et la dégradation de CKs .....	24
Figure 12 : Présentation schématique des voies de biosynthèse et signalisation de l’ABA. ....	26
Figure 13 : Représentation schématique d’une chambre phytotronique.....	38
Figure 14 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes séparément lors de l’expérimentation de 2014. ....	41
Figure 15 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes séparément lors de l’expérimentation de 2016. ....	42
Figure 16 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes séparément lors de l’expérimentation de janvier à avril 2017. ....	42
Figure 17 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes lors de l’expérimentation de mai-juin 2018. ....	44
Figure 18 : Principe de mesure des pigments photosynthétiques par le Dualex d’après la plaquette d’utilisation. ....	46
Figure 19 : Mesure de la conductance et de l’assimilation par le Li-Cor 6200 et principe de l’appareil issu du manuel du constructeur. ....	46
Figure 20 : Schéma du système ouvert issu du manuel d’utilisation du Li-6400XT.....	48
Figure 21 : Schéma du dispositif pour les courbes de réponse au VPD. ....	48
Figure 22 : Résumé des paramètres dérivés de l’ajustement au modèle sigmoïdal. ....	50
Figure 23 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les deux géotypes lors de l’expérimentation 4. ....	65

Figure 24 : Évolution des paramètres de croissance pour les deux génotypes soumis à 5 doses d'O <sub>3</sub> différentes. ....	68
Figure 25 : Cinétique d'évolution des échanges gazeux foliaires pour Carpaccio et Robusta soumis à différentes doses d'O <sub>3</sub> . ....	71
Figure 26 : Evolution du POD <sub>0</sub> en fonction du temps pour les deux génotypes, Carpaccio et Robusta, soumis à cinq traitements de fumigation d'O <sub>3</sub> . ....	73
Figure 27 : Cinétique d'évolution des pigments foliaires pour Carpaccio et Robusta soumis à différentes doses d'O <sub>3</sub> . ....	75
Figure 28 : Réponse des paramètres physiologiques foliaires au POD <sub>0</sub> . ....	76
Figure 29 : Comparaison photographique du type de symptômes observés en fonction de la fumigation d'O <sub>3</sub> pour les deux génotypes Carpaccio et Robusta. ....	78
Figure 30 : Détermination du contenu en peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	79
Figure 31 : Bilan schématique de la différence de réponse des deux génotypes de peupliers Carpaccio et Robusta soumis à l'O <sub>3</sub> . ....	84
Figure 32 : Impact of ozone or/and water deficit on net CO <sub>2</sub> assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour (g <sub>w</sub> ). ....	98
Figure 33 : Evolution of the Phytotoxic Ozone Dose (POD <sub>0</sub> ) in the Carpaccio and Robusta genotypes under different water status over the 17 days of O <sub>3</sub> exposure. ....	100
Figure 34 : Impact of ozone or/and water deficit on ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) contents. ....	102
Figure 35 : Expression of ascorbate (A) and glutathione (B) contents, MDHAR (C), DHAR (D), and GR (E) activities relatively to the Phytotoxic Ozone Dose (POD <sub>0</sub> ). ....	103
Figure 36 : Impact of ozone or/and water deficit on MDHAR, DHAR, and GR activities. ....	105
Figure 37 : Ozone- or/and water deficit- driven regulation of gene expression for genes encoding the enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle. ....	106
Figure 38 : Integrated analysis of the impact of ozone or/and water deficit on the ascorbate-glutathione cycle. ....	108
Figure 39 : Theoretical representation of the evolution of biological parameters relative to control with POD <sub>0</sub> as ozone dose. ....	114
Figure 40 : Schéma du dispositif O <sub>3</sub> -FACE (Florence, Italie) issu de Paoletti et al. (2017). ....	117
Figure 41 : Quantification du contenu en ascorbate total en µmol.g <sup>-1</sup> de matière sèche (DW) dans les feuilles de <i>Quercus ilex</i> , <i>Q. pubescens</i> et <i>Q. robur</i> exposées à l'O <sub>3</sub> (air ambiant (AA), 1.2 × O <sub>3</sub> ambiant et 1.4 × O <sub>3</sub> ambiant, 1.2 × AA et 1.4 × AA) et soumises à différents régimes hydriques (well-watered (WW), moderate drought (MD) et severe drought (SD)). ....	119
Figure 42 : Quantification du contenu total en glutathion (GSH) exprimé en µmol.g <sup>-1</sup> de matière sèche (DW) dans les feuilles de <i>Quercus ilex</i> , <i>Q. pubescens</i> et <i>Q. robur</i> exposées à l'O <sub>3</sub> (air ambiant (AA), 1.2 × O <sub>3</sub> ambiant et 1.4 × O <sub>3</sub> ambiant 1.2 × AA et 1.4 × AA) et soumises à différents régimes hydriques (well-watered (WW), moderate drought (MD) et severe drought (SD)). ....	120



Figure 43 : Contenus totaux en (A) ascorbate et (B) glutathion, exprimés en fonction de l'indice Phytotoxic ozone dose above a threshold of 0 nmol.mm <sup>-2</sup> . .....	121
Figure 44 : Cinétique de réponse de la teneur en chlorophylles (A) et en anthocyanes (B) chez Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. ....	126
Figure 45 : Cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) par la technique de coloration au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) pour les arbres soumis aux traitements O <sub>3</sub> et/ou déficit hydrique à 1, 2, 4 et 11 jours de traitement. ....	127
Figure 46 : Analyse en composantes principales de la distribution des échantillons (A) en fonction de la corrélation de 32 phytohormones (B) sur un plan factoriel à deux dimensions. ....	128
Figure 47 : Evolution des teneurs en acide abscissique (ABA) et en acide dihydrophaséique dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. ....	131
Figure 48 : Evolution des teneurs en IAA et OxIAA dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. ....	132
Figure 49 : Evolution des teneurs en ACC, SA et JA dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. ....	133
Figure 50 : Evolution des teneurs foliaires en cZR et cZOG+cZROG dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique.....	134
Figure 51 : Evolution des teneurs foliaires en tZs et leurs formes désactivées réversibles dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O <sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. ....	134
Figure 52 : Bilan schématique de la réponse hormonale du génotype de peuplier Robusta soumis à l'O <sub>3</sub> et à la sécheresse.....	141
Figure 53 : Evolution of the soil relative water content (REW) calculated from soil water humidity for the Carpaccio and Robusta genotypes and for the water deficit treatments. ....	154
Figure 54 : Impact of O <sub>3</sub> or/and water deficit on total chlorophylls (A, B), net CO <sub>2</sub> assimilation (C, D) and stomatal conductance to water vapour (E, F). ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 55 : Sigmoidal model parameters of stomatal dynamics in response to irradiance changes for the two Carpaccio and Robusta poplar genotypes submitted to 80 ppb of O <sub>3</sub> after 13 days (A, B, E, F, J, K), or 21 days (C, D, H, I, L, M), submitted to 80 ppb of O <sub>3</sub> for 14 days and/or water deficit for an additional week.....	160
Figure 56 : Sigmoidal model parameters of stomatal dynamics in response to VPD change for the two Carpaccio and Robusta poplar genotypes after 13 days (A, C, E) or 21 days (B, D, F), submitted to 80 ppb of O <sub>3</sub> for 14 days and/or water deficit for an additional week.....	162
Figure 57 : Combined successive impacts of O <sub>3</sub> exposure and moderate water deficit on the parameters of the sigmoidal model for irradiance and VPD responses for the Carpaccio and Robusta genotypes. ....	164
Figure 58 : Hypothetical stomatal daily courses in natural conditions for both genotypes after O <sub>3</sub> exposure, water deficit treatment or the combined treatment.....	168
Figure 59 : Quantification du contenu total en ascorbate (A et B) en µmol.g <sup>-1</sup> de matière fraîche (FW), et du contenu total en glutathion (GSH) (C et D), exprimé en µmol.g <sup>-1</sup> de matière fraîche (FW), dans les feuilles de	

Carpaccio et Robusta exposées à l'O <sub>3</sub> pendant 13 jours, puis à un déficit hydrique avec un retour en condition air filtré.....	178
Figure 60 : Cinétique de réponse de des teneurs en anthocyane chez Carpaccio et Robusta soumis à l'O <sub>3</sub> puis au déficit hydrique. ....	182
Figure 61 : Bilan schématique de la différence de réponse des deux génotypes de peupliers Carpaccio et Robusta soumis à l'O <sub>3</sub> et ou au déficit hydrique .....	184

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Résumé des expérimentations valorisées par le travail de thèse.....	40
Tableau 2 : Noms et abréviations des phytohormones pouvant être déterminées lors du profilage hormonal. ...	52
Tableau 3 : Différentes méthodes de détermination de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> parmi les plus couramment utilisés sur les extraits végétaux. ....	58
Tableau 4 : Nombre de feuilles et masse sèche (MS) des tiges et feuilles des génotypes Carpaccio et Robusta soumis à une fumigation d'O <sub>3</sub> de 0, 80, 120, 150 pendant 12 jours et 8 jours pour le traitement 200 ppb. ....	70
Tableau 5 : Characteristics of the genes and primer sequences used for qPCR analyses. ....	95
Tableau 6 : Impact of water deficit or/and ozone on growth parameters in the Carpaccio and Robusta genotypes. ....	97
Tableau 7 : Significativité de l'ANOVA à 3 facteurs de l'effet de l'O <sub>3</sub> , de la sécheresse (drought) et de l'espèce de chêne (plant species) .....	118
Tableau 8 : Indicateurs des conditions de culture du génotype Robusta soumis à l'O <sub>3</sub> et à la sécheresse. ....	124
Tableau 9 : Impacts de l'O <sub>3</sub> et du déficit hydrique sur les paramètres de croissance du génotype Robusta. ....	125
Tableau 10 : Résultats de l'ANOVA à 3 facteurs incluant le déficit hydrique (WD), la fumigation à l'ozone (O <sub>3</sub> ) et le temps (Time) sur les deux dimensions de l'analyse en composantes principales (Dim.1 et Dim.2). ....	129
Tableau 11 : Noms et abréviations des phytohormones détectées lors du profilage hormonal. ....	130
Tableau 12 : Présentation des gènes d'intérêt sélectionnés en lien avec les voies de biosynthèse ou de signalisation des différentes hormones. ....	145
Tableau 13 : Average O <sub>3</sub> exposure represented by SUM00 (sum of hourly O <sub>3</sub> concentrations) and AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb) as well as metric dose (POD <sub>0</sub> , Phytotoxic Ozone Dose above a threshold flux of 0 nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) at the end of the fumigation period for Robusta and Carpaccio. ....	154
Tableau 14 : Effet du génotype, du traitement O <sub>3</sub> , du déficit hydrique (WD) et de leur interaction à 14 et 21 jours sur le contenu en ascorbate total (Total AsA), en glutathion total (Total GSH) et sur le pourcentage de réduction des deux métabolites. ....	179

# Table des matières

---

Chapitre I. Introduction .....	1
I.1. Les plantes face aux stress causés par leur environnement.....	2
I.1.1. Généralités sur le stress .....	2
I.1.2. Augmentation des épisodes de sécheresse : conséquence directe du réchauffement climatique.....	4
I.1.2.1. Définition de la sécheresse étudiée .....	4
I.1.2.2. Prédiction d'évolution de l'exposition à la sécheresse.....	4
I.1.3. Ozone troposphérique.....	5
I.1.3.1. Formation de l'ozone troposphérique .....	5
I.1.3.2. Passé, présent et futur niveaux d'O <sub>3</sub> dans la troposphère.....	7
I.1.4. Combinaison de la sécheresse et de l'O <sub>3</sub> : deux possibilités .....	10
I.1.4.1. Combinaison simultanée : des conditions météorologiques identiques propices aux deux stress .....	10
I.1.4.2. Combinaison successive : pics printaniers d'O <sub>3</sub> et sécheresses estivales.....	10
I.2. Impact de l'O <sub>3</sub> et/ou de la sécheresse sur les végétaux .....	11
I.2.1. Symptômes visibles et impact sur la croissance .....	11
I.2.2. L'évitement par fermeture des stomates.....	13
I.2.3. Le stress oxydant et les métabolismes antioxydants .....	15
I.2.4. Focus sur le cycle Haliwell-Asada-Foyer.....	19
I.2.5. De multiples voies de détection et de signalisation .....	21
I.2.6. Focus sur le rôle des phytohormones .....	23
I.2.6.1. Auxines .....	23
I.2.6.2. Cytokinines .....	25
I.2.6.3. Acide abscissique.....	27
I.2.6.4. Jasmonates .....	28
I.2.6.5. Acide salicylique.....	29
I.2.6.6. Éthylène .....	29
I.2.6.7. « Cross-talk » hormonal sous stress oxydant .....	29
I.3. Analyse du risque causé par l'O <sub>3</sub> sur la végétation.....	31
I.4. Problématique et objectifs de la thèse .....	33

Chapitre II. Matériels et méthodes .....	37
II.1. Culture des peupliers.....	39
II.1.1. Génotypes utilisés .....	39
II.1.2. Conditions de fumigation O <sub>3</sub> .....	39
II.1.3. Expérimentation 1 - 2014 (Chapitre IV) .....	41
II.1.4. Expérimentation 2 - 2016 (Chapitre IV) .....	43
II.1.5. Expérimentation 3 - 2017 (Chapitre V).....	43
II.1.6. Expérimentation 4 - 2018 (Chapitre III) .....	45
II.2. Paramètres suivis .....	47
II.2.1. Paramètres de croissance.....	47
II.2.2. Mesure non destructives des pigments photosynthétiques.....	47
II.2.3. Mesure des échanges gazeux.....	49
II.2.3.1. Cinétique de mesure instantanée.....	49
II.2.3.2. Courbe de réponse d'ouverture/fermeture des stomates .....	49
II.2.4. Phytohormones.....	53
II.2.5. Détermination du contenu foliaire en ascorbate et glutathion.....	53
II.2.5.1. Méthode spectrophotochimique.....	53
II.2.5.2. Méthode HPLC .....	54
II.2.6. Activité enzymatique.....	55
II.2.6.1. Procédure extraction, filtration et dosage de protéines .....	55
II.2.6.2. Dosage de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR, EC 1.6.5.4).....	55
II.2.6.3. Dosage de la déhydroascorbate réductase (DHAR, EC 1.8.5.1).....	56
II.2.6.4. Dosage de la glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2) .....	56
II.2.7. Détermination de la présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
II.2.7.1. Cytolocalisation H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> au 3,3'-diaminobenzidine .....	56
II.2.7.2. Détermination biochimique .....	57
II.2.8. Analyse de l'expression des gènes .....	59
II.2.8.1. Isolation des ARN et synthèse d'ADNc .....	59
II.2.8.2. Réaction en chaîne par polymérase - Real-Time RT-PCR .....	59
II.2.8.3. Sélection des amorces.....	60
II.2.8.4. Real-Time RT-PCR data analysis.....	60

II.2.9. Indicateur de seuil de risque à l’ozone .....	61
II.3. Analyses statistiques .....	62
Chapitre III. Evaluation de la sensibilité des deux génotypes de peupliers en réponse à l’ozone.....	63
III.2. Introduction : les deux génotypes dans la littérature .....	64
III.3. Résultats expérimentation 4.....	69
III.3.1. Différence de croissance des deux génotypes de peuplier .....	69
III.3.2. Impacts sur les échanges gazeux et conséquences pour le POD <sub>0</sub> .....	71
III.3.3. Pigments.....	73
III.3.4. Évolution en fonction du POD <sub>0</sub> .....	77
III.3.5. Détermination du peroxyde d’hydrogène et des symptômes visibles.....	77
III.4. Discussion.....	79
III.4.1. Différences génotype-spécifiques .....	79
III.4.2. Des différences de réponse à l’O <sub>3</sub> ? .....	80
III.4.3. Deux stratégies différentes ? .....	82
Chapitre IV. Réponse du peuplier soumis à la combinaison simultanée de contraintes ozone et sécheresse .....	85
IV.1. Introduction .....	86
IV.2. Analyse intégrative de la détoxification de 2 génotypes de peuplier soumis à l’ozone et la sécheresse: Focus sur le cycle ascorbate-glutathione .....	88
IV.2.1. Introduction.....	89
IV.2.2. Materials and methods .....	91
IV.2.2.1. Plant material and exposure conditions.....	91
IV.2.2.2. Gas exchange measurements and POD <sub>0</sub> calculations .....	92
IV.2.2.3. Leaf sampling.....	92
IV.2.2.4. Enzymatic activity assays.....	93
IV.2.2.5. Ascorbate and Glutathione Determination.....	94
IV.2.2.6. Gene analysis .....	94

IV.2.3. Results.....	96
IV.2.3.1. Growth, leaf fall, and biomass .....	96
IV.2.3.2. Gas exchanges.....	99
IV.2.3.3. Antioxidant responses – Ascorbate-glutathione cycle .....	100
IV.2.4. Discussion.....	109
IV.2.4.1. Two genotypes with one ozone response each? .....	109
IV.2.4.2. Two genotypes tolerant to mild water deficit.....	112
IV.2.4.3. Synergism, antagonism, or additive effect of combined stresses? .....	113
IV.3. Implication de l'AsA et du GSH en réponse à l'O <sub>3</sub> et/ou la sécheresse chez trois espèces de chênes.....	116
IV.3.1. Présentation du dispositif expérimental.....	116
IV.3.2. Évolution du cycle ascorbate-glutathion chez le chêne en combinaison de stress	
118	
IV.3.3. Résumé/discussion.....	122
IV.4. Régulation et signalisation phytohormonales du génotype Robusta.....	123
IV.4.1. Résultats.....	125
IV.4.1.1. Paramètres de croissance.....	125
IV.4.1.2. Pigments photosynthétiques et détermination du peroxyde d'hydrogène .....	126
IV.4.1.3. Profilage hormonal.....	129
IV.4.2. Discussion autour du rôle des phytohormones et identification de marqueurs moléculaires potentiels.....	135
IV.4.2.1. Marqueurs de la maturation de la feuille en condition contrôle.....	135
IV.4.2.2. Régulation des voies hormonales sous O <sub>3</sub> .....	136
IV.4.2.3. Régulation des voies hormonales sous déficit hydrique .....	137
IV.4.2.4. Quelles interactions en combinaison de stress ? .....	139
IV.4.2.5. Perspectives de marqueurs moléculaires.....	142
IV.5. Bilan du chapitre .....	146

## Chapitre V. Réponse du peuplier soumis à une succession ozone & sécheresse

149

V.1. Introduction du chapitre.....	150
V.2. Altered stomatal dynamics of two Euramerican poplar genotypes submitted to successive ozone exposure and water deficit .....	151
V.2.1. Introduction.....	152
V.2.2. Materials and methods .....	155
V.2.2.1. Plant material and exposure conditions .....	155
V.2.2.2. Plant growth.....	155
V.2.2.3. Gas exchanges and photosynthetic pigment kinetics.....	156
V.2.2.4. Stomatal response to irradiance and vapour pressure deficit.....	156
V.2.2.5. Statistical analyses.....	157
V.2.3. Results .....	159
V.2.3.1. Effect on growth, chlorophyll contents and gas exchange kinetics .....	159
V.2.3.2. Effect of O <sub>3</sub> and recovery of stomatal behaviour .....	161
V.2.3.3. Effect of water deficit on stomatal behaviour.....	164
V.2.3.4. Effects of O <sub>3</sub> and water deficit on stomatal behaviour .....	166
V.2.4. Discussion .....	166
V.2.4.1. Sluggish stomatal response to O <sub>3</sub> .....	166
V.2.4.2. Water deficit induces slower stomatal closure in response to light and VPD .....	169
V.2.4.3. Antagonistic effect of the successive exposure to O <sub>3</sub> and water deficit .....	169
V.2.4.4. Consequences for modelling .....	170
V.2.5. Conclusion .....	171
V.2.6. Supplementary data.....	173
V.3. Implication de l'ascorbate et du glutathion .....	178
V.3.1. Résultats .....	178
V.3.2. Discussion .....	180
V.3.3. Figures supplémentaires.....	182



Chapitre VI. Discussion générale.....	183
VI.1. Différence génotype-spécifique : deux stratégies de réponse à l'O <sub>3</sub> .....	185
VI.1.1. Contrôle de l'ouverture/fermeture des stomates.....	185
VI.1.2. Des différences de détoxification ?.....	188
VI.1.3. Une réflexion à l'échelle du plant.....	190
VI.2. Tolérance relative au déficit hydrique.....	192
VI.3. Combinaison de l'O <sub>3</sub> et de la sécheresse : un effet majoritairement antagoniste.....	194
VI.4. Enjeux pour la modélisation.....	197
Conclusion .....	198
Bibliographie.....	199
Annexe .....	219

“ *It would be a Herculean task to review all the literature on Ozone* ”

Monks, 2015



# **Chapitre I. Introduction**

---

## I.1. Les plantes face aux stress causés par leur environnement

### I.1.1. Généralités sur le stress

Tout organisme vivant est en interaction permanente avec son environnement. Ces interactions peuvent être dues à des paramètres biotiques ou abiotiques, nommés généralement facteur écologique (Ramade, 2009). Parmi les organismes vivants, les plantes, du fait de leur immobilité, sont les plus confrontées aux variations environnementales et souvent à plusieurs facteurs simultanés. De par leur caractère fluctuant, ces facteurs environnementaux peuvent, lorsqu'ils deviennent non favorables au développement du végétal, devenir des facteurs de stress. Pour la plante, l'initiation du stress se traduit par la déstabilisation d'un état standard (Lichtenthaler, 1998) (Figure 1). La plante peut alors soit faire face au stress grâce à la mise en place de mécanismes cellulaires de réparation ou de protection menant à une acclimatation et une résistance, soit dans le cas où le stress est trop important, être dépassée et subir des dommages menant à la mort cellulaire. Le stress peut avoir un impact plus ou moins important en fonction de sa fréquence et de son intensité, i.e. l'impact est « dose-dépendant » (Lichtenthaler, 1998).

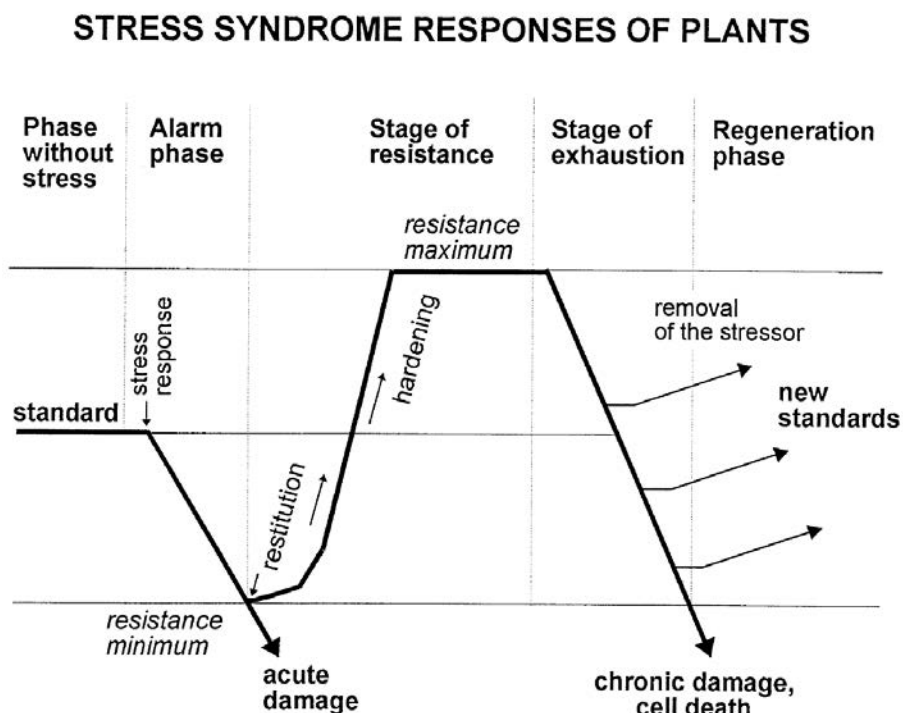


Figure 1 : Concept général décrivant les différentes phases de réponse des plantes à un stress. Les plantes se développent dans des conditions physiologiques standards. En réponse à un stress, différents mécanismes de réponse/défense sont activés. Après l'arrêt du stress, un nouvel état standard physiologique peut être atteint. Cependant, cet état dépendra de la durée et de l'intensité du stress (Lichtenthaler, 1998).

Au début de l'exposition, lors de la phase de détection, un déclin de certaines fonctions physiologiques comme la perte de photosynthèse ou de transport de métabolites peut être observé. Ces modifications entraînent une perturbation de l'homéostasie, une déviation de l'équilibre standard physiologique. Si la plante est faiblement tolérante ou si le stress est trop important, on parle de stress aigu (« acute stress»), qui peut entraîner rapidement une sénescence et des dommages irréversibles. Dans le cas d'un stress chronique ne dépassant pas les capacités de réponse de la plante, des processus sont mis en place pour lui faire face, comme la régulation des flux métaboliques et l'activation de processus de réparation, ou des adaptations morphologiques à la contrainte. Ces réponses vont permettre la résistance au stress. Leur mise en place progressive correspond au phénomène d'acclimatation. De nouveau, selon la durée de la contrainte et l'intensité du stress engendré, deux cas de figure sont possibles : soit la plante atteint un nouveau standard, c'est-à-dire un nouvel équilibre, soit l'accumulation des dégâts dépasse les capacités de réparation de la plante, entraînant la mort cellulaire. Ces dommages peuvent être observés en stress aigu court ou en stress chronique long.

Un enjeu majeur de l'étude des stress abiotiques est de mettre en évidence les mécanismes clés de défense permettant la sélection de plantes tolérantes. Cependant, la sélection de variétés végétales prend en compte comme premiers critères de sélection le rendement agricole ou forestier. La notion de tolérance *vs* sensibilité des plantes est un concept ambigu. D'un point de vue économique, et notamment dans un contexte de sélection de variétés végétales, une plante tolérante à un facteur de stress est une plante qui va maintenir une forte productivité (croissance importante, bonne qualité du bois, production de fruits...), tandis qu'une plante sensible montrera des dégâts importants et une forte diminution de la croissance. Néanmoins, du point de vue du physiologiste végétal, le concept de tolérance peut simplement correspondre à la survie de la plante sous stress. En effet, certains mécanismes d'évitement permettent la survie de la plante au détriment de la productivité. De plus, les mécanismes ayant trait à la défense des plantes sont multiples et dépendent fortement des conditions données liées à la culture des plantes, de l'intensité et de la fréquence du stress (Tardieu, 2012).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous intéresserons aux réponses de la plante face au stress oxydant engendré particulièrement par deux facteurs environnementaux : l'ozone troposphérique (O<sub>3</sub>) et la sécheresse édaphique, autrement nommée déficit hydrique du sol.

## **I.1.2. Augmentation des épisodes de sécheresse : conséquence directe du réchauffement climatique**

### ***I.1.2.1. Définition de la sécheresse étudiée***

La notion de sécheresse est relative au sujet d'étude (hydrologie, météorologie, pédologie). Globalement, cette notion caractérise un manque d'eau occasionnel et circonscrit dans le temps contrairement à l'aridité qui caractérise une pénurie d'eau structurelle. Une sécheresse édaphique ou déficit hydrique du sol résulte d'un déficit de précipitations pendant la saison de végétation (au printemps et en été) et d'un manque d'eau disponible dans le sol pour les plantes. Les sécheresses de 2003 et 2011 étaient de parfaits exemples de sécheresse édaphique. Elle se distingue donc de la sécheresse hydrologique, qui survient lorsque les précipitations hivernales sont insuffisantes pour permettre la reconstitution des réserves (nappes, barrages) et de la sécheresse météorologique, qui caractérise une période de déficit de précipitations. Dans le cadre de l'étude des mécanismes de réponse des plantes en réponse au déficit hydrique du sol, si le contraire de la sécheresse se définit par une disponibilité en eau optimale pour le fonctionnement de la plante, alors celle-ci peut être considérée en condition de sécheresse dès que la quantité d'eau disponible est limitante pour la photosynthèse, entraînant ainsi une réponse cellulaire (fermeture stomatique, régulation homéostatique).

### ***I.1.2.2. Prédiction d'évolution de l'exposition à la sécheresse***

L'augmentation des concentrations de gaz à effet de serre a été identifiée par le Groupe Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) comme la cause du réchauffement climatique, réchauffement qui devrait, selon les modèles, être de l'ordre de 3 à 8°C supplémentaires sur la température moyenne d'ici la fin du siècle (GIEC 4°, Solomon, 2007). D'après le quatrième rapport du GIEC, cette hausse de la température aura pour conséquence l'augmentation des épisodes climatiques extrêmes, la diminution de la pluviométrie et l'augmentation des phases de sécheresse. Le cinquième rapport indique un manque d'observations pour affirmer l'augmentation des sécheresses à un niveau global, mais précise que cela pourrait masquer un impact à l'échelle régionale, notamment en région méditerranéenne avec une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses (Lehner et al., 2006 ; GIEC 5°, 2014). Aux États-Unis, les modèles basés sur la diminution de la pluviométrie en hiver et l'augmentation de la température maximale et du déficit de pression à la vapeur d'eau (VPD) en été prédisent une augmentation de la mortalité des forêts couplée à des épisodes de sécheresse (Park Williams et al., 2013).

Au-delà de ces prédictions, la mortalité accrue de peuplements forestiers ayant pour cause la sécheresse et l'augmentation de température est déjà un fait, le risque étant d'observer à plus long terme une multiplication des dépérissements de forêts (Allen et al., 2010). De plus, un affaiblissement de certains peuplements forestiers européens dû à la forte sécheresse de 2003 a été observé, ce qui a conduit à une augmentation de la mortalité des peuplements lors des épisodes moins importants qui ont suivi, en 2004 et 2005 (Bréda et al., 2006).

Au niveau du sol, la sécheresse se traduit par une diminution du contenu en eau, caractérisé par un pourcentage d'humidité volumique. L'intensité de la sécheresse perçue par les plantes est directement liée à la teneur du sol en eau et souvent exprimée par un contenu d'eau extractible par la plante (REW, *relative extractible water*) (Bogeat-Triboulot et al., 2007). Il est couramment admis qu'une plante subit un déficit hydrique lorsque le REW est inférieur à 40 %, seuil à partir duquel la conductance stomatique et donc la transpiration diminuent graduellement (Granier et al., 1999). La limitation de la disponibilité en eau va entraîner des modifications physiologiques significatives liées à l'importance de l'eau pour le bon fonctionnement du végétal. Parmi ces modifications, il faut citer entre autres, sans ordre ici : (i) le ralentissement voir l'arrêt de la croissance (Granier et al., 1999), (ii) l'ajustement osmotique pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Buckley & Mott, 2002; Marron et al., 2003), (iii) les modifications des échanges gazeux, la fermeture des stomates et la diminution de l'assimilation (manque de CO<sub>2</sub> et d'eau) (Bogeat-Triboulot et al., 2007; Granier et al., 1999) et (iv) la mise en place d'une cascade de signalisation impliquant notamment l'acide abscissique (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Susmilch et al., 2017).

Si la sécheresse se prolonge dans le temps, la fermeture des stomates peut ne pas être suffisante pour limiter la diminution de la pression hydrique dans le xylème, ce qui peut conduire au phénomène de cavitation : la formation de bulle d'air qui conduit à une rupture hydraulique du continuum sol-plante-atmosphère. Dans ce cas, si la plante ne retourne pas en condition normale, elle se dessèche jusqu'à éventuellement mourir (Choat et al., 2012).

### **I.1.3. Ozone troposphérique**

#### ***I.1.3.1. Formation de l'ozone troposphérique***

Les premières références littéraires à l'O<sub>3</sub> remontent à l'histoire grecque, dans *l'Iliade et l'Odyssée* (VIII<sup>e</sup> siècle av. J.-C) plus précisément, où les marins décrivent une odeur particulière après un orage. En 1785, le chimiste Van Marum génère de l'O<sub>3</sub> en laboratoire en faisant passer un arc électrique dans du dioxygène (O<sub>2</sub>). C'est seulement en 1839 que cette odeur fut attribuée à une forme allotropique de l'oxygène (trioxygène) par C. Schönbein.



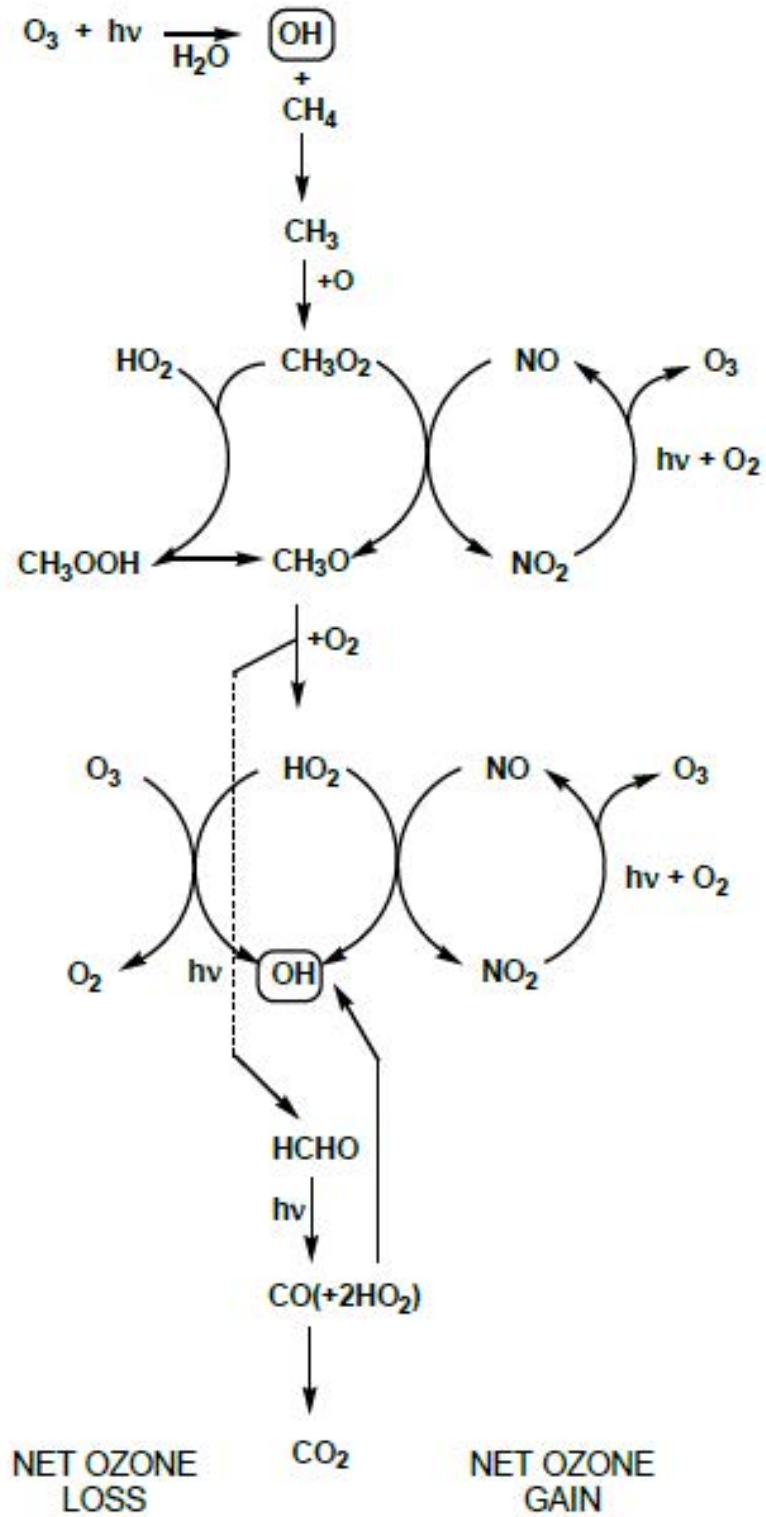


Figure 2 : Mécanismes simplifiés de la formation photochimique de l’ozone (Lightfoot et al., 1992). Le mécanisme central est constitué de la photodissociation du dioxyde d’azote ( $NO_2$ ) en monoxyde d’azote et un atome d’oxygène ( $O$ ). Cet atome réagit avec le dioxygène ( $O_2$ ) pour former l’ $O_3$ .

Il nommera cette substance « ozein », qui signifie « exhaler une odeur » en grec. Les recherches de la fin du XIX<sup>e</sup> se concentrent ensuite sur les propriétés chimiques de l'O<sub>3</sub>. À partir des années 1920, le spectromètre de G. Dobson, physicien à l'université d'Oxford, permet la mesure de l'O<sub>3</sub> dans l'atmosphère et la découverte des fluctuations journalières et saisonnières de ses concentrations. Le XX<sup>e</sup> siècle permettra de découvrir la répartition de l'O<sub>3</sub> dans l'atmosphère et le rôle protecteur de la couche d'O<sub>3</sub> stratosphérique. En effet, le gaz est majoritairement présent dans la stratosphère où il forme une barrière aux ultraviolets : la couche d'O<sub>3</sub> (concentration d'environ 10 ppm). Il est également présent dans la troposphère (18 à 15 premiers kilomètres d'atmosphère) à des concentrations annuelles moyennes très faibles, de l'ordre de 10 à 50 ppb. En 1970, un nouveau paradigme émerge : la production d'O<sub>3</sub> est équilibrée par des pertes dues à des réactions catalytiques avec les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) et le radical hydroxyle (HO), mais les activités humaines peuvent influencer la balance (production/perte). La formation d'O<sub>3</sub> dans la troposphère (Figure 2) peut être brièvement résumée comme étant l'oxydation par HO du monoxyde de carbone (CO), du méthane (CH<sub>4</sub>) ou de composés organiques volatils (COV) en présence de NO<sub>x</sub> (Monks et al., 2015). En somme, l'O<sub>3</sub> est un polluant secondaire instable avec un fort pouvoir oxydant qui est formé à partir de précurseurs lors de réactions photochimiques. Durant la même période, les grandes villes voient apparaître le développement d'un brouillard de pollution appelé « SMOG » (combinaison de « smoke » et « fog »). Les premiers symptômes dus au SMOG sur les plantes sont signalés par Middleton et al. (1950) à Los Angeles. Ce sont cependant les travaux de Haagen-Smit et al. (1952) qui permettront d'attribuer définitivement ces symptômes à l'O<sub>3</sub> grâce à la recréation en laboratoire de SMOG artificiel par combustion de pétrole en présence d'O<sub>3</sub>.

### ***1.1.3.2. Passé, présent et futur niveaux d'O<sub>3</sub> dans la troposphère***

Les premières mesures de l'O<sub>3</sub> troposphérique commencent au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle. Environ 300 stations de mesure sont recensées, réparties principalement aux États-Unis et en Europe. Néanmoins, peu de stations mesurent les concentrations de manière continue (Vingarzan, 2004). La première mesure quantitative de l'O<sub>3</sub> de surface réalisée en continu a lieu à l'observatoire météorologique du Montsouris (Paris), pour des valeurs comprises entre 6 et 15 ppb entre 1876 et 1910 (Volz & Kley, 1988). Jusqu'aux années 80-90, le développement des stations de mesures stagne. Du milieu du XIX<sup>e</sup> à la fin du XX<sup>e</sup>, les concentrations globales d'O<sub>3</sub> sont donc estimées à partir des valeurs de quelques stations de mesure seulement. Or, la concentration d'O<sub>3</sub> pour une zone géographique donnée dépend d'une combinaison de facteurs

liés à la formation, au transport, à la destruction et à la déposition du gaz (Vingarzan, 2004). De ces difficultés de mesures associées à une forte hétérogénéité spatiale découle une importante variabilité des modèles utilisés pour prédire les concentrations passées et futures d'O<sub>3</sub> à partir de l'évolution des gaz précurseurs. Malgré ces limites, il a pu être estimé que les concentrations moyennes d'O<sub>3</sub> ont doublé au XX<sup>e</sup> siècle (Vingarzan, 2004). Quelles données sont alors disponibles pour la période actuelle ? De 2000 à 2018, les mesures du satellite IASI tendent à montrer une stabilisation des concentrations moyennes d'O<sub>3</sub> dans la colonne troposphérique à la surface du globe (Gaudel et al., 2018). L'analyse géographique des concentrations mensuelles moyennes montre une tendance à la stabilisation malgré des différences locales (Oltmans et al., 2013). En effet, de 2000 à 2014, la tendance est à la diminution en Amérique du Nord, la stabilisation en Europe et l'augmentation en Asie (Gaudel et al., 2018; Mills et al., 2018). Ces variations observées d'un continent à l'autre sont fortement liées aux émissions des précurseurs. Depuis 1990, une portion importante des émissions anthropogéniques qui produisent l'O<sub>3</sub> troposphérique sont passées des États-Unis d'Amérique (USA) et de l'Union européenne (UE) à l'Asie (Zhang et al., 2016). A une échelle plus fine, des concentrations journalières non négligeables peuvent être enregistrées en périphérie des villes. Elles sont alors dues au transport de l'O<sub>3</sub> et à l'absence de recyclage par les NO<sub>x</sub> en zone périurbaine (Figure 3).

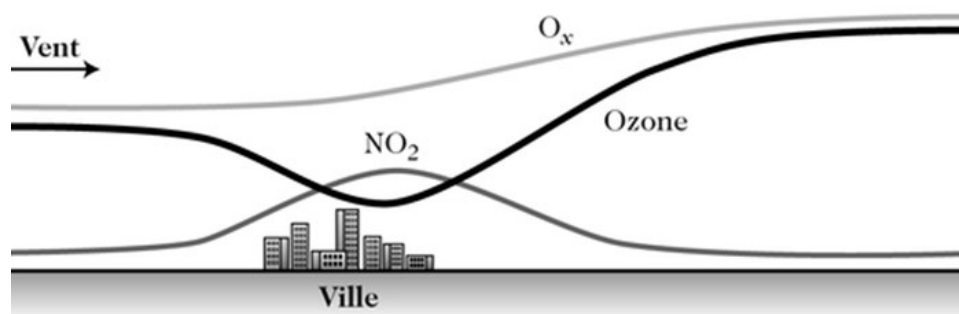


Figure 3 : Traversée (de gauche à droite) schématique d'une agglomération par une masse d'air transportée par le vent. Les courbes indiquent les niveaux de concentrations obtenues au cours de la traversée. O<sub>x</sub> représente ici la somme O<sub>3</sub> + NO<sub>2</sub>. (Delmas et al., 2005)

Les modèles prédictifs de l'évolution des concentrations d'O<sub>3</sub> sont fortement dépendants des politiques concernant les émissions anthropiques des précurseurs de l'O<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>, CH<sub>4</sub>...). En effet, l'évolution des concentrations futures d'O<sub>3</sub> est simulée à partir de ses concentrations passées et présentes et intègre les émissions de précurseurs ainsi que l'évolution des températures selon les modèles climatiques du GIEC (les scénarios RCP, *Representative Concentration Pathway*). Les simulations suggèrent une augmentation des concentrations de la

couche troposphérique de 50% depuis l'époque préindustrielle (Horowitz, 2006). En 2004, Vingarzan proposait une estimation de l'évolution des concentrations futures basée sur les scénarios climatiques du GIEC de 2001, passant de concentrations moyennes, selon les stations étudiées, qui allaient de 20-40 ppb en 2000 à 42-80 ppb pour 2100 (+ 50%). Une modélisation plus récente publiée en 2013 par Young et ses collaborateurs au sein du projet « Atmospheric Chemistry and Climate Model Intercomparison Project » montre une évolution différente, *i.e.* dans la plupart des scénarios RCP du 5<sup>e</sup> rapport du GIEC, les concentrations d'O<sub>3</sub> seraient stables voire diminueraient de l'ordre de -4% à -16%. Le modèle RCP8.5 (forçage radiatif le plus élevé +8.5 W.m<sup>-2</sup>) est une exception puisqu'il prédit une augmentation de 18% des concentrations moyennes d'O<sub>3</sub> sur la période 2000 à 2100, due principalement à une augmentation massive de méthane. Des tendances similaires sont trouvées par San José et al. (2016).

## **I.1.4. Combinaison de la sécheresse et de l'O<sub>3</sub> : deux possibilités**

### ***I.1.4.1. Combinaison simultanée : des conditions météorologiques identiques propices aux deux stress***

En partant du simple fait que l'O<sub>3</sub> est produit par réaction photochimique, il se conçoit aisément que lors de passages anticycloniques garantissant un temps sec et ensoleillé, la production de la molécule sera plus importante. Ces conditions climatiques sont fréquentes lors des mois d'été, particulièrement juillet et août alors que les épisodes de sécheresse sont plus fréquents. Des données récentes provenant du satellite IASI montrent que l'Est méditerranéen est fortement affecté par l'augmentation des concentrations moyennes d'O<sub>3</sub>, particulièrement durant les mois d'été (Kalabokas et al., 2017). Un autre exemple marquant en Europe est celui de la vague de chaleur du mois d'août 2003. En Angleterre, des pics journaliers supérieurs à 100 ppb d'O<sub>3</sub> ont été mesurés, contre 40 à 60 ppb en période normale (Lee et al., 2006).

### ***I.1.4.2. Combinaison successive : pics printaniers d'O<sub>3</sub> et sécheresses estivales***

La multiplication des mesures d'O<sub>3</sub> troposphérique durant le XX<sup>e</sup> siècle a rapidement permis de mettre en évidence que ses concentrations dans l'atmosphère évoluaient selon un cycle saisonnier (Stolarski, 2001; Vingarzan, 2004). Même si un maximum estival est fréquent sur certains sites, un maximum printanier (avril-mai) est rapporté sur des latitudes de 10 à 60° (Kalabokas et al., 2017; Vingarzan, 2004). Dans l'hémisphère Nord, P. Monks (2000) a distingué trois causes principales probables expliquant ce pic printanier :

- Un échange d'O<sub>3</sub> entre la troposphère et la stratosphère
- Une prolongation du temps de vie photochimique de l'O<sub>3</sub> en hiver responsable d'une accumulation du gaz durant l'hiver
- Une accumulation des précurseurs de l'O<sub>3</sub> durant l'hiver et une production photochimique plus importante au printemps

Le pic d'O<sub>3</sub> printanier est conjoint avec la reprise de la végétation en mai-juin. Il pourrait précéder des épisodes de sécheresse plus tardifs dans la saison de végétation. Par conséquent, les plantes peuvent se retrouver exposées à des sécheresses importantes en juillet-août en ayant déjà fait face, un peu plus tôt dans l'année, à des doses élevées d'O<sub>3</sub> (Pollastrini et al., 2014). Les résultats obtenus par Pollastrini et son équipe suggèrent que les plantes soumises à des fortes concentrations d'O<sub>3</sub> au printemps pourraient donc être particulièrement sensibles aux sécheresses estivales.

## I.2. Impact de l'O<sub>3</sub> et/ou de la sécheresse sur les végétaux

### I.2.1. Symptômes visibles et impact sur la croissance

En réponse à ces deux facteurs de stress, l'un des premiers marqueurs visibles sur les plantes est l'apparition de symptômes foliaires. Dans le cas de l'O<sub>3</sub>, les feuilles peuvent présenter des chloroses et des nécroses (Vollenweider et al., 2003). Le symptôme le plus commun est l'apparition de points (« stipules ») de couleur brune ou blanche selon l'espèce considérée et majoritairement présents sur la surface adaxiale de la feuille (Feng et al., 2014; Moura et al., 2018). Entre 2007 et 2015, un programme de bio-surveillance de l'ICP végétation a identifié des dégâts foliaires induits par l'O<sub>3</sub> sur 60 espèces végétales dans 19 pays différents de l'hémisphère nord (Harmens et al., 2016). La sécheresse peut également conduire à l'apparition de chlorose, suivie d'un flétrissement précédant une chute prématurée des feuilles (Bréda et al., 2006). Pour les arbres décidus, un enroulement de la feuille et l'apparition de nécroses dues au dessèchement a été constaté (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). D'ailleurs, en condition naturelle, des défoliations du houppier peuvent permettre d'identifier les arbres atteints par le déficit hydrique ou l'O<sub>3</sub> (Bréda et al., 2006; Sicard et al., 2016b).

Les deux contraintes vont également modifier la croissance des arbres. La littérature O<sub>3</sub> a été décortiquée par une première méta-analyses de Wittig et al. (2007) et mise à jour 10 ans plus tard par Li et al. Brièvement, la méthode prend en compte, pour un paramètre donné, différentes sources de variation en réponse à l'O<sub>3</sub>: (a) le type de plante, (b) la concentration moyenne d'O<sub>3</sub> et le type d'expérimentation (phytotron, serre ou champs) et (c) la durée de l'exposition au gaz. Sous O<sub>3</sub>, la croissance en hauteur et en diamètre du tronc est ralentie, la taille des feuilles diminue, et, plus généralement, la biomasse (partie aérienne et racinaire) est plus faible (Li et al., 2017; Wittig et al., 2007, 2009)(Figure 4). En réponse à un déficit hydrique progressif (Bogeat-Triboulot et al., 2007), la diminution de la croissance radiale de *Populus euphratica* est la première à être détectée, suivie par la croissance en hauteur (jusqu'à son arrêt). La croissance racinaire est réduite en dernier.

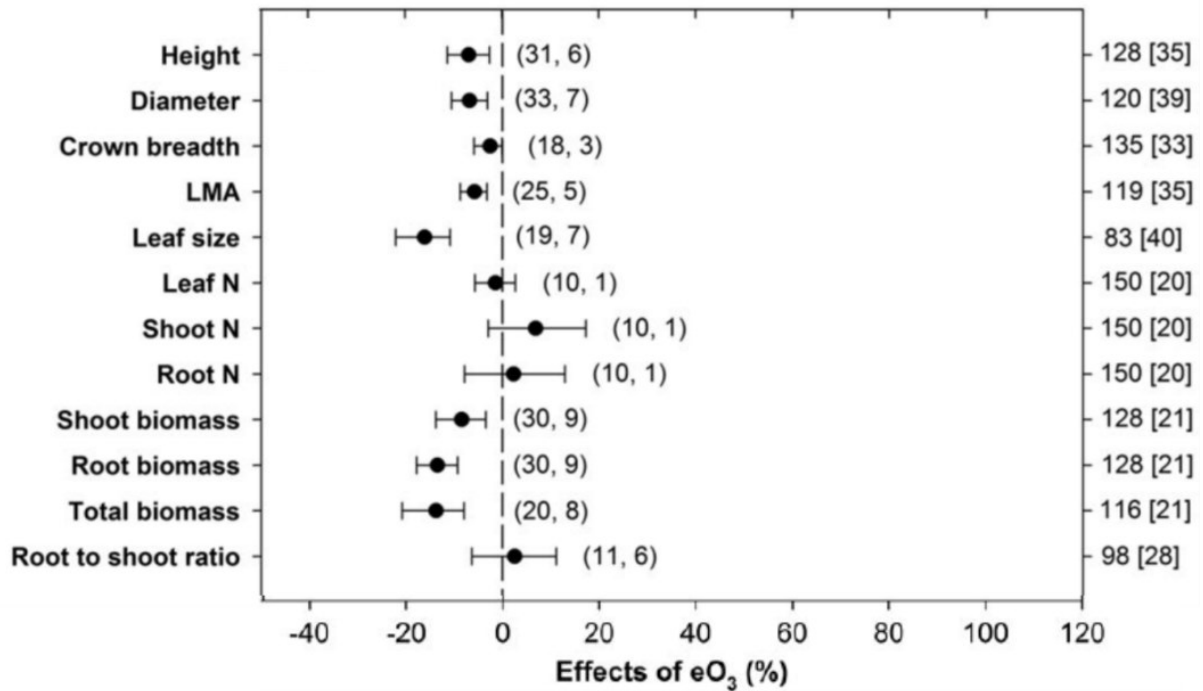


Figure 4 : Méta-analyse de l'effet de l' $O_3$  sur des paramètres de croissance pour plusieurs espèces ligneuses. Les symboles représentent le pourcentage moyen de changement entre des concentrations d' $O_3$  élevées et le témoin. Les bars montrent l'intervalle de confiance 95 % (bootstrapped). Le nombre de mesures et d'articles est inscrit entre parenthèses et la moyenne des concentrations d' $O_3$  est entre crochets (axe des ordonnées). Li et al, (2017)

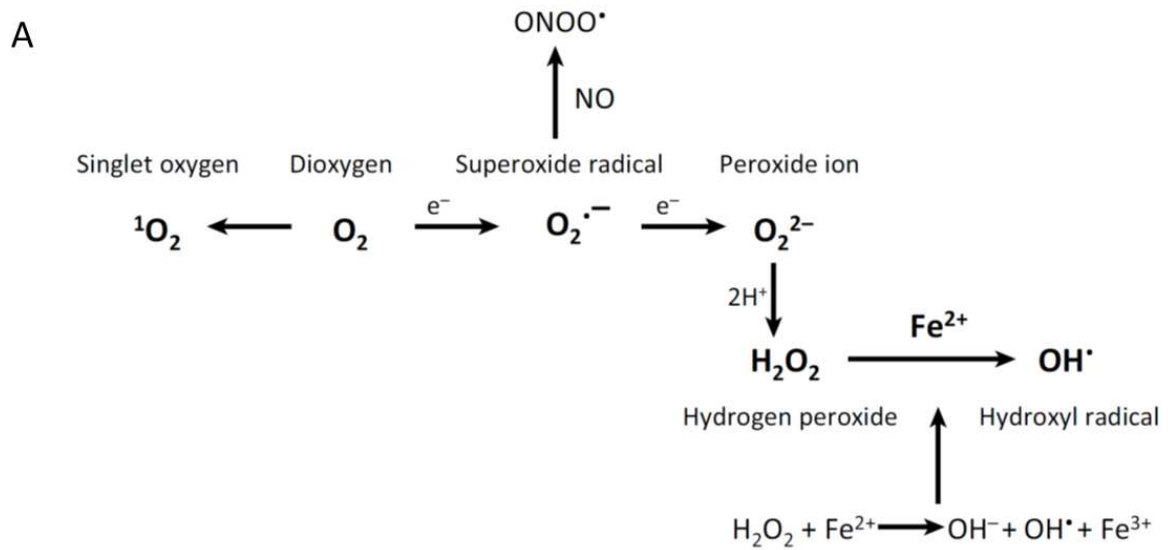
L' $O_3$  est notamment responsable d'une baisse de rendements des systèmes agricoles et forestiers. Par exemple pour l'agriculture, la diminution des récoltes de blé due à l' $O_3$  est estimée de l'ordre de 10 à 15%. Les pertes économiques globales dans le domaine agricole sont estimées entre 11 et 18 milliards de dollars (Avnery et al., 2011a). D'après les différents scénarios d'émission de précurseurs, la fluctuation des concentrations d' $O_3$  pourrait menacer la sécurité alimentaire mondiale et la production forestière (Avnery et al., 2011b; Castell & Thiec, 2016). Concernant les systèmes forestiers, en France métropolitaine, la forêt représentait environ 16.9 millions d'hectares en 2015 ([www.inventaire-forestier.ign.fr](http://www.inventaire-forestier.ign.fr)). L'impact de l' $O_3$  ou de la sécheresse pourrait avoir un effet très important sur les écosystèmes forestiers aussi bien en termes de pertes économiques (production de bois) qu'en termes de pertes de services écosystémiques (stockage du carbone). Ce contexte explique l'importance de comprendre les mécanismes liés à la tolérance au stress pour augmenter la résistance/résilience des systèmes agricoles et forestiers face aux modifications majeures du climat.

### **I.2.2. L'évitement par fermeture des stomates**

Les stomates sont des pores situés sur l'épiderme des feuilles. Ils sont constitués de deux cellules de garde qui forment une ouverture appelée l'ostiole. Le contrôle du degré d'ouverture par les cellules de garde permet la régulation des échanges gazeux ( $H_2O$ ,  $CO_2$ , etc.) entre la feuille et l'air. Il existe donc un lien étroit entre contrôle de l'ouverture des stomates et la photosynthèse (Farquhar & Sharkey, 1982; Hetherington & Woodward, 2003). Des facteurs environnementaux tels que la lumière, le  $CO_2$ , le déficit de pression de vapeur d'eau (VPD) et la température régulent l'ouverture et la fermeture de ces pores (Hetherington & Woodward, 2003; McAdam & Brodribb, 2015; Wang et al., 2010). Le contrôle de l'ouverture des stomates par des signaux environnementaux dépend de plusieurs mécanismes coordonnés impliquant des réarrangements de l'organisation du cytosquelette (Eun & Lee, 1997; Higaki et al., 2010) et la régulation de la turgescence via des transporteurs membranaires, notamment des canaux ioniques (pompes à protons, canaux calciques, etc.), permettant une régulation osmotique (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Kollist et al., 2014; McAinsh et al., 2002). La mise en place de ces mécanismes est le résultat du contrôle de l'expression de certains gènes par des phytohormones, l'acide abscissique (ABA) entre autres (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Pessaraki, 2018; Susmilch et al., 2017).

L'étude du rôle majeur exercé par les stomates sur les cycles de l'eau et du carbone revêt un intérêt important. En effet, ces 60 dernières années, de nombreux modèles ont été développés par la communauté scientifique pour tenter de prédire la conductance stomatique. Ce paramètre correspond aux taux de passage du  $CO_2$  entrant et de la vapeur d' $H_2O$  sortante des feuilles. Parmi ces modèles, la plupart sont empiriques, basés sur des corrélations entre des facteurs environnementaux ou internes et la conductance stomatique (Damour et al., 2010). La mise en place de modèle mécanistique permettrait de les transposer à des conditions environnementales différentes (Bunce, 1997; Damour et al., 2010). Mais pour cela, il faut intégrer les effets des facteurs de stress sur la réponse des stomates. En effet, que ce soit dans le cas de l' $O_3$  ou de la sécheresse, le premier niveau de défense de la plante est l'évitement par fermeture des stomates (Castagna & Ranieri, 2009; Noctor et al., 2014; Tardieu & Simonneau, 1998). Dans le cas de la sécheresse, le contrôle des stomates permet de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration, tandis que dans le cas de l' $O_3$ , il permet de limiter les entrées du gaz. Cependant, l'obtention d'un équilibre entre les entrées de  $CO_2$  nécessaires pour alimenter la photosynthèse et la maintenance des processus vitaux est nécessaire au maintien du fonctionnement physiologique de la plante sous contraintes.





**B**

ROS	$t_{1/2}$	Migration distance	Mode of action	Production site	Scavenging systems
Superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )	1–4 $\mu\text{s}$	30 nm	Reacts with Fe–S proteins Dismutates to $\text{H}_2\text{O}_2$	Apoplast (RBOHs), chloroplasts, mitochondria, peroxisomes, electron transfer chains	SOD, flavonoids, ascorbate...
Hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ )	1 ns	1 nm	Extremely reactive with all biomolecules including DNA, RNA, lipids, and proteins	Iron and $\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton reaction)	Flavonoids, proline, sugars, ascorbate,...
Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	>1 ms	>1 $\mu\text{m}$	Reacts with proteins by attacking cysteine and methionine residues. Reacts with heme proteins. Reacts with DNA.	Peroxisomes, chloroplasts, mitochondria, cytosol, apoplast	APX, CAT, GPX, PER, PRX, ascorbate, glutathione,...
Singlet oxygen ( ${}^1\text{O}_2$ )	1–4 $\mu\text{s}$	30 nm	Oxidizes lipids, proteins (Trp, His, Tyr, Met, and Cys residues), and G residues of DNA	Membranes, chloroplasts, nuclei	Carotenoids and $\alpha$ -tocopherol

Figure 5 : Formation et propriétés des principaux ROS. (A) Formation des différents ROS à partir du dioxygène ( $\text{O}_2$ ). L'excitation ou la réduction de l' $\text{O}_2$  peut directement générer l'oxygène singulet ( ${}^1\text{O}_2$ ) ou le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Le superoxyde peut se dismuter pour former le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut interagir avec le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pour former le radical hydroxyle. (B) Propriétés des principaux ROS,  $t_{1/2}$ , le temps de demi-vie de la molécule, la distance de migration de la source de production, le mode d'action, le site de production et les principaux mécanismes de défense chez les plantes (Mittler, 2017).

Plus précisément, en condition de déficit hydrique, les stomates se ferment en réponse au déclin de la turgescence foliaire, au fort VPD (souvent associé à la sécheresse du sol) ou à la génération de l'ABA par les racines (Chaves, 2004; McAdam & Brodribb, 2015). De multiples mécanismes se mettent également en place en réponse à la sécheresse, qui impliquent particulièrement l'ABA et les autres phytohormones (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Pessaraki, 2018).

Dans le cas d'une exposition à l'O<sub>3</sub>, les cellules de garde seront les premières au contact du gaz. La formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut entraîner la fermeture des stomates via la production d'ABA (McAdam et al., 2017) et la modification du transport d'ions dans les cellules de gardes (Dumont et al., 2014a; Vahisalu et al., 2008, 2010). Par ailleurs, un ralentissement de l'ouverture/fermeture des stomates a été également constaté chez différentes espèces et nommé « stomatal sluggishness » en anglais (Dumont et al., 2013; Hoshika et al., 2013; Paoletti & Grulke, 2010). En prenant plus de temps pour se fermer ou s'ouvrir, les stomates modifient la dose d'O<sub>3</sub> entrante et modifient l'efficacité d'utilisation de l'eau (Hoshika et al., 2015). En plus d'induire la fermeture des stomates et donc les entrées de CO<sub>2</sub>, le gaz est également responsable d'une diminution de la fixation du carbone par le cycle de Calvin, causant une modification directe du fonctionnement de la photosynthèse. Il en résulte un découplage de la photosynthèse et de la conductance stomatique, ce qui complique la prédiction de l'un par rapport à l'autre (Lombardozzi et al., 2012).

### **I.2.3. Le stress oxydant et les métabolismes antioxydants**

La plupart des stress biotiques ou abiotiques (*e.g.* sécheresse, ozone...) entraînent un stress oxydant chez les plantes. Celui-ci est dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 5). Les ROS sont responsables de l'oxydation de nombreuses molécules telles que l'ADN, l'ARN, des protéines et des lipides (Mittler, 2017). Naturellement présents dans la plante, les ROS jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques (division cellulaire, différenciation et développement). Néanmoins, leur surproduction peut être néfaste, jusqu'à engendrer un stress oxydant. En effet, ce dernier peut se définir par un taux d'oxydation incontrôlé causé par un taux de production de ROS qui excède les capacités métaboliques de la plante (Foyer & Noctor, 2011).

Dans le cas de l'O<sub>3</sub>, le gaz pénètre par les stomates à l'intérieur de la feuille. Une fois dans la cavité sous-stomatique, l'instabilité et le fort pouvoir oxydant de l'O<sub>3</sub> vont conduire à la formation des ROS (Figure 7). De la rapidité de la réaction résulte l'absence d'O<sub>3</sub> en tant que tel (forme gazeuse) dans les feuilles (Laisk et al., 1989).

La sécheresse est également responsable d'un stress oxydant (Figure 6). En effet, suite à la fermeture des stomates due au déficit hydrique, on observe un phénomène de production endogène de ROS dû à des fuites d'électrons, surtout au niveau des photosystèmes à l'intérieur des chloroplastes (Edreva, 2005; Miller et al., 2010), mais également dans le peroxyssome à cause de l'augmentation de la photorespiration (Figure 6).

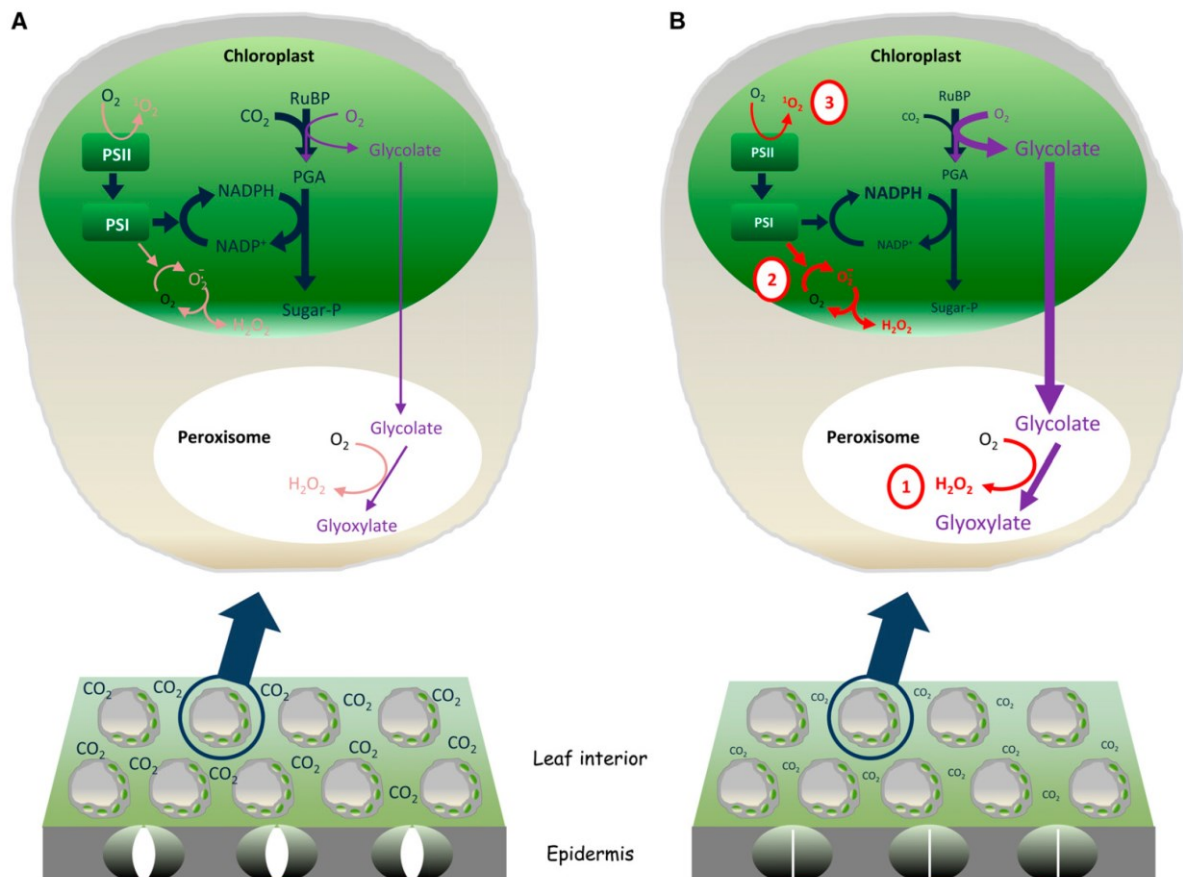


Figure 6 : Concept de la formation des ROS sous sécheresse (Noctor et al., 2014). (A) Schéma d'une section de feuille de plante bien irriguée pour laquelle une concentration cellulaire en  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) permet une régénération efficace de la production d'oxydants et limite l'oxygénation du RUBP. (B) Le déficit hydrique induit une fermeture des stomates qui réduit l'entrée de  $\text{CO}_2$ . Il en résulte une augmentation de la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le peroxyssome (1) et une augmentation possible de la production d'anions superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2) ou d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) (3) par la chaîne de transport d'électrons dans le chloroplaste.

En réponse au stress oxydant généré par l' $\text{O}_3$  ou la sécheresse, l'ensemble des mécanismes de détoxification et de réparation cellulaire face au ROS représente le deuxième niveau de défense (Castagna & Ranieri, 2009). On distingue deux catégories de défense antioxydantes : une composante enzymatique et des métabolites non enzymatiques (De Gara et al., 2010). Les enzymes antioxydantes sont localisées dans différents compartiments cellulaires (Mittler, 2002). Les superoxydes dismutases (SODs) qui catalysent la dismutation de l'ion superoxyde

et dont les isoformes sont présents dans l'apoplasme et le symplasme (cytosol, chloroplastes, mitochondries), en sont un bel exemple. Par contre, les catalases (CATs), liées au métabolisme du peroxyde, sont principalement restreintes aux peroxysomes. Les métabolites antioxydants, quant à eux, sont de faible poids moléculaire et présents à des concentrations plus faibles que le substrat utilisable (ROS). Ils peuvent cependant prévenir ou inverser leur oxydation (Halliwell & Gutteridge, 1989). L'antioxydant le plus abondant dans les cellules végétales est l'acide ascorbique (AsA) ou vitamine C, mais il en existe de nombreux autres, tels que le glutathion (GSH), la N-acétylcystéine ou encore des composés phénoliques, par exemple les flavonols. Certains de ces composés, comme les tocophérols, les caroténoïdes et les xanthophylles, possèdent des propriétés lipophiles et sont localisés au niveau des membranes notamment dans les chloroplastes au niveau des thylakoïdes. Le rôle de ces antioxydants dans les mécanismes de défense de la plante à un stress oxydant est de plus en plus étudié. En effet, dans le cas d'une exposition à l'O<sub>3</sub>, la littérature décrit des augmentations de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>) associés à la dégradation des lipides (augmentation de MDA, Figure 7). En réponse au stress oxydant associé, une augmentation de certains composés, tels que les phénols, ou de l'activité d'enzymes liées à l'AsA et au GSH (Figure 77) a été observée. Sous sécheresse, la littérature décrit des augmentations des contenus en AsA et en GSH. Néanmoins, le statut redox de l'AsA n'est pas modifié, quand celui du GSH tend à diminuer (%DHA et %GSSG, Figure 8). Dans le même temps, des augmentations des antioxydants lipophiles, dont le rôle est lié à la dispersion de l'excès d'énergie, ont été constatées (Figure 8). Aussi bien dans le cas d'une exposition à l'O<sub>3</sub> qu'en situation de déficit hydrique, si le stress oxydant est trop intense et les molécules de défense dépassées, l'augmentation des ROS peut conduire à l'activation de mécanismes de mort cellulaire (Noctor et al., 2017, 2014).

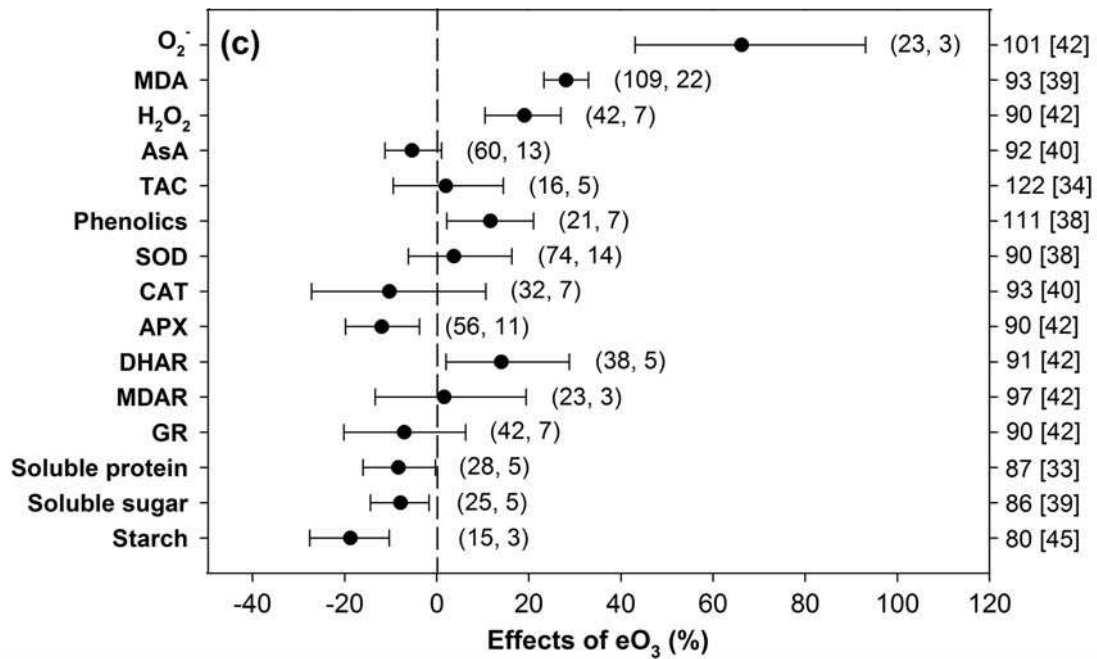


Figure 7 : Effet de concentrations élevées d’ozone [O<sub>3</sub>] (eO<sub>3</sub>) sur des mécanismes antioxydants des arbres (Li et al., 2017). Les symboles représentent le pourcentage moyen de changement entre des concentrations élevées d’O<sub>3</sub> et le témoin. Les bars montrent l’intervalle de confiance 95 % (bootstrapped). Le nombre de mesures et d’articles est indiqué entre parenthèses, la moyenne des concentrations d’O<sub>3</sub> est entre crochets (axe des ordonnées). APX = ascorbate peroxidase ; AsA = ascorbate ; Car = caroténoïde ; CAT = catalase ; DHAR = dehydroascorbate reductase ; GR = glutathione reductase ; MDA = malondialdehyde ; MDAR = monoascorbate reductase ; SOD = superoxide dismutase ; TAC = total antioxidant capacity.

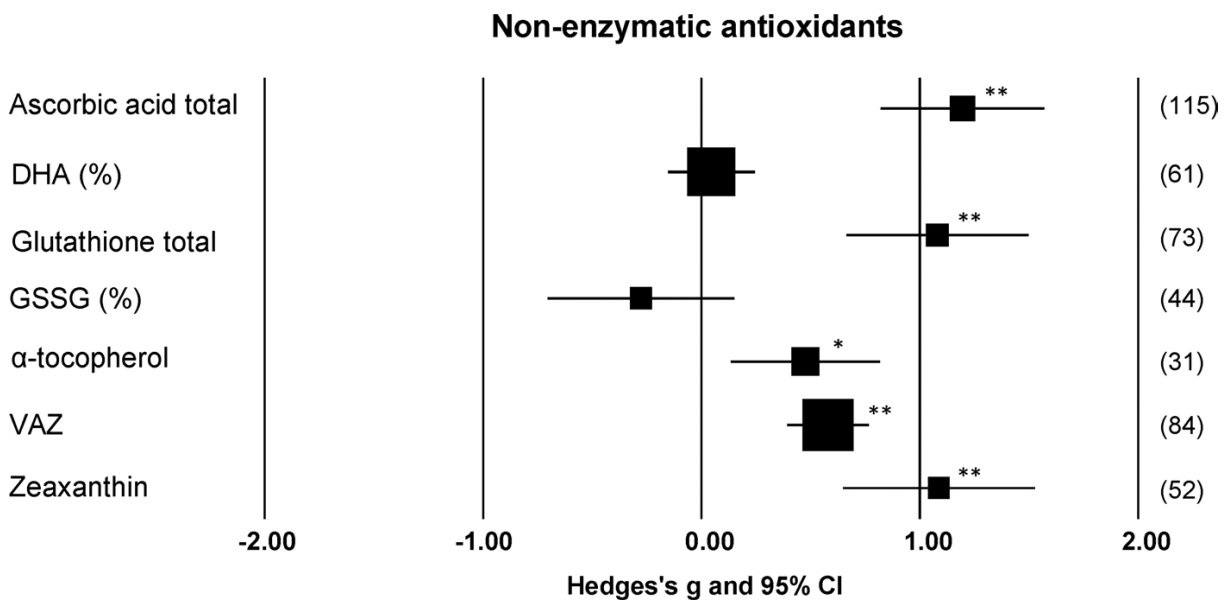


Figure 8 : Effet taille (hedges’s g) et intervalles de confiance 95% de la réponse d’antioxydants non enzymatiques foliaires et de leur statut redox sous déficit hydrique. Le nombre d’articles pour chaque symbole est indiqué entre parenthèses. \*P < 0.01; \*\*P < 0.001. (Wujeska et al., 2013).

#### **I.2.4. Focus sur le cycle Halliwell-Asada-Foyer**

L'ascorbate (AsA) et le glutathion (GSH) se distinguent des autres antioxydants pour trois raisons. Premièrement, ils sont couplés au métabolisme du peroxyde d'hydrogène par des enzymes spécifiques (des peroxydases, la glutathione S-transférase, etc.). Deuxièmement, les formes oxydées de l'ascorbate et du glutathion sont relativement stables. Enfin, ces formes oxydées peuvent être recyclées grâce à des enzymes tirant leur pouvoir réducteur du NAD(P)H. C'est grâce ces propriétés que le cycle Halliwell-Asada-Foyer (HAF) (Figure 9), également nommé cycle ascorbate-glutathion, a été défini comme « *the heart of the Redox Hub* » (Foyer & Noctor, 2011).

En plus d'être l'antioxydant le plus présent dans les cellules végétales, la présence de l'AsA dans l'apoplasme le place en première ligne de défense contre le stress oxydant induit par l'O<sub>3</sub> (Burkey & Eason, 2002; Conklin & Barth, 2004; Polle et al., 1995; Ranieri et al., 1996). Bien que présent en plus faible quantité dans l'apoplasme que dans le reste de la cellule, l'AsA apoplasmique peut être déterminant dans la réponse de la plante à ce stress (Krasensky-Wrzaczek & Kangasjärvi, 2018; Zechmann, 2011). Néanmoins, la réaction avec les ROS dans l'apoplasme n'est ni suffisante pour expliquer des différences de sensibilité entre deux clones de peupliers (D'Haese et al., 2005; Ranieri et al., 1999) ni suffisante pour contrer les effets négatif de l'O<sub>3</sub> chez le tabac, le soja ou d'autres génotypes de peupliers (Dai et al., 2018). L'AsA oxydé dans l'apoplasme doit être régénéré dans le cytosol. Pour cela, le cycle HAF, et plus précisément le GSH, entre en jeu. Des travaux récents réalisés dans le laboratoire montrent un fort effet du traitement O<sub>3</sub> sur les gènes de la biosynthèse du glutathion ainsi que des différences importantes de pool de glutathion réduit entre peupliers « tolérants » et « sensibles » (Dumont, 2013). Le glutathion serait donc un élément clé dans les processus de détoxification. Par ailleurs, de nombreuses études soulignent l'importance des enzymes du cycles ascorbate-glutathion en réponse à l'O<sub>3</sub> (Eltayeb et al., 2006; Gandin et al., 2019; Pasqualini et al., 2001; Rahantaniaina et al., 2017a). En effet, les enzymes (APX, DHAR, MDHAR et GR) assurent le bon fonctionnement du cycle (Figure 9). Or, une régénération efficace de l'AsA et du GSH peut être déterminante pour faire face au stress induit par l'O<sub>3</sub>.

Comme précédemment mentionné, la sécheresse entraîne, quant à elle, des modifications au niveau du cycle HAF. Chez différentes espèces d'arbres, des augmentations dans l'activité des enzymes et du contenu en GSH et AsA ont été rapportées sous cette contrainte (Nogués et al., 2014; Wang et al., 2012). L'augmentation du contenu en GSH dans les feuilles de peupliers serait également responsable d'une meilleure adaptation au déficit hydrique modéré (Samuilov et al., 2016). Par ailleurs, les transcrits et l'activité enzymatique couplés au cycle HAF sont stimulés sous déficit hydrique et fonctionnent de manière synergique entre les différents compartiments cellulaires (Laxa et al., 2019).

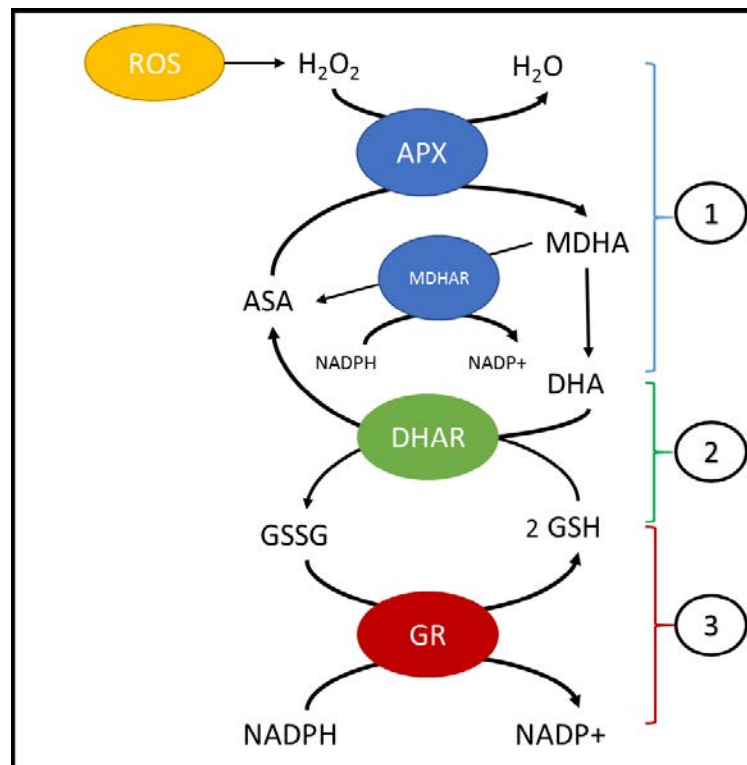


Figure 9 : Cycle Halliwell-Asada-Foyer (HAF) ou cycle ascorbate-glutathion. (1) Prise en charge du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par l'acide ascorbique réduit (AsA) et l'ascorbate peroxydase (APX), ce qui conduit à la formation d'ascorbate oxydé, monodéhydroascorbate (MDHA) et déhydroascorbate (DHA). La régénération de l'AsA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) est dépendante du pouvoir réducteur (NAD(P)H). (2) A partir du DHA la régénération de l'AsA va se faire par la déhydroascorbate réductase (DHAR) dépendante du glutathion. (3) La régénération du glutathion (GSH) se fera par la glutathion réductase (GR) dépendante du pouvoir réducteur (NADPH).

### I.2.5. De multiples voies de détection et de signalisation

En cas de stress oxydant causé par des contraintes abiotiques ou biotiques, des mécanismes de détection et de signalisation sont activés au niveau cellulaire (Baier et al., 2005; Jaspers & Kangasjärvi, 2010; Miller et al., 2010; Vaultier & Jolivet, 2015; Wilkinson & Davies, 2010). Ces mécanismes peuvent varier en fonction de la contrainte et du compartiment cellulaire considéré. De nombreuses publications décrivent d'ores et déjà les mécanismes connus. Il est donc nécessaire de préciser que la signalisation ne sera pas traitée ici de manière exhaustive : seuls les acteurs majeurs ayant un rôle dans la réponse de la plante au stress oxydant seront présentés. Une attention toute particulière sera portée aux phytohormones.

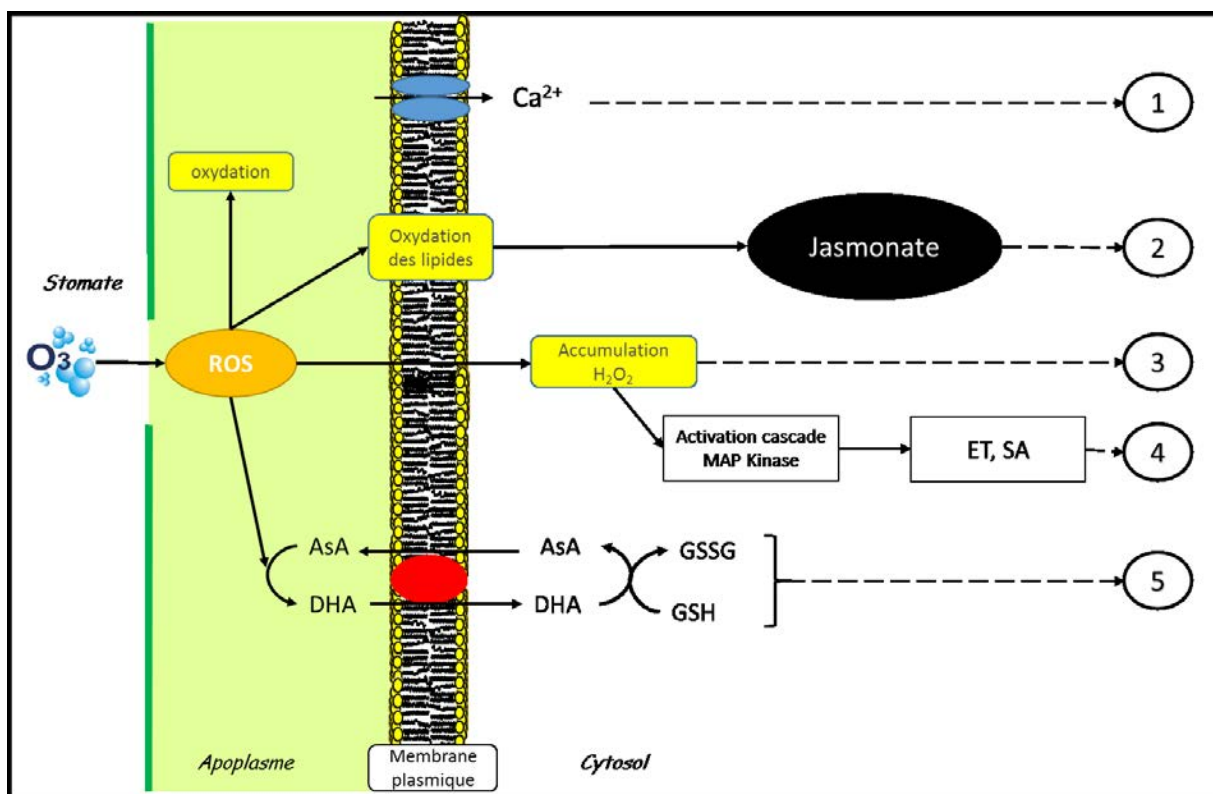


Figure 10: Représentation schématique des voies de signalisation les mieux décrites activées sous  $O_3$  lors d'un stress oxydant (adapté de Baier et al., 2005). (1) Accumulation de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol. (2) L'oxydation des lipides de la membrane plasmique entraîne l'activation de la voie des jasmonates. (3) Accumulation des ROS, modification de l'homéostasie cellulaire. (4) Activation MAPK conduisant à la régulation de l'éthylène (ET) et de l'acide salicylique (SA). (5) Altération de la balance des pools antioxydants du cycle ascorbate-glutathion. AsA, acide ascorbique ; DHA, déhydroascorbate ; GSSG, glutathione disulfide ; GSH, glutathion ; ROS, espèces oxygénées réactives.



Parmi les premiers acteurs de la signalisation, il a été montré que les ROS, en plus de leur activité oxydante potentiellement délétère, jouent un rôle important. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est le plus stable des ROS et qui a un potentiel de réaction spécifique avec des groupements thiol est placé en tête de liste pour la transmission du signal (Foyer & Noctor, 2016). L'oxydation par les ROS d'un certain nombre de molécules (thiorédoxines, glutathion S transférase, ascorbate...) aura pour conséquence la modification du statut redox et de l'équilibre du ratio de certains métabolites (GSH :GSSG, ascorbate :dehydroascorbate) conduisant à l'activation ou l'inactivation d'enzymes. L'oxydation localisée au niveau des membranes va déclencher ou perturber les canaux ioniques et le transport d'ions ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^+$ ,  $Fe^{2+}$ ...). Ainsi, une accumulation de  $Ca^{2+}$ , second messenger, dans le cytosol a été observé sous  $O_3$  (Baier et al., 2005). La dégradation des lipides au niveau de la membrane peut conduire à l'activation de voies de signalisation liées aux phospholipases, MAP kinases et à la régulation des phytohormones : jasmonates, éthylène, acide abscissique et acide salicylique (Figure 10).

## **I.2.6. Focus sur le rôle des phytohormones**

Les phytohormones sont un groupe de substances organiques présent à faible concentration qui influencent les processus physiologiques (Davies, 2004). Cela concerne principalement la croissance, la différenciation cellulaire et le développement, mais d'autres processus peuvent être concernés tels que le contrôle des mécanismes ouverture/fermeture des stomates. Des données expérimentales récentes démontrent l'interaction de multiples phytohormones entre-elles, ces interactions peuvent être synergiques ou antagonistes et sont souvent définis par le terme « cross-talk », responsables de la signalisation et du réajustement de la croissance et de l'acquisition de la tolérance au stress (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Hartig & Beck, 2006; Kohli et al., 2013). L'interaction la plus connue est celle de l'auxine et des cytokinines responsables de la division cellulaire liée à la dominance apicale ou à la formation des racines (Hartig & Beck, 2006).

### **I.2.6.1. Auxines**

L'auxine (acide indole-acétique, IAA) est la première phytohormone découverte. Il faudra environ 50 ans entre la découverte d'un régulateur de croissance par Darwin (père et fils) et l'identification de l'IAA par le chimiste Kögl, en 1934 (Sauer et al., 2013). L'auxine est responsable de la régulation de différents mécanismes de croissance, dont celui de dominance apical, le phototropisme et le gravitropisme, mais également des processus de maturation du fruit, de contrôle de la sénescence et d'abscission des feuilles (Davies, 2004; Sauer et al., 2013; Woodward & Bartel, 2005). Chez les plantes, l'IAA est synthétisé via des voies liées au tryptophane. La voie de biosynthèse principale identifiée chez *Arabidopsis thaliana* utilise l'indol-3-ylpyruvique acide (IPA) et est régulée par les gènes de la famille des YUCCA. L'homéostasie de l'IAA est, quant à elle, régulée par différents mécanismes incluant la biosynthèse, le transport, la dégradation, des réactions de conjugaison-déconjugaison et d'oxydation (Woodward & Bartel, 2005). Les formes conjuguées de l'auxine permettent le stockage et le transport longue distance d'une forme active de l'IAA ou, dans le cas de la forme conjuguée à l'aspartate (IAA-Asp), d'intermédiaires de dégradation. Chez le peuplier, les formes IAAs, acide 2-oxindole-3-acétique (OxIAA) et les formes en anneaux hydroxylés de l'OxIAA sont les formes majeures formées après adjonction d'IAA exogène (Davies, 2004). L'OxIAA a une faible activité biologique et se forme de manière rapide et irréversible en réponse à une augmentation des niveaux d'auxine (Pencik et al., 2013). Or, l'homéostasie de cette hormone est affectée sous stress oxydant, car les ROS, via le métabolisme du glutathion, peuvent perturber la biosynthèse et le transport d'IAA (Bashandy et al., 2010). Par ailleurs,

l'auxine peut modifier la régulation redox de l'ascorbate peroxidase (Correa-Aragunde et al., 2013). Enfin, le « cross-talk » entre les ROS et IAA joue également un rôle dans la tolérance au déficit hydrique en modulant l'architecture de la plante (croissance de la tige et forme des feuilles) (Tognetti et al., 2012, 2010). Cependant, bien que des relations entre ROS et voies de l'auxine aient été mises en évidence, l'IAA n'a pas été encore étudié de manière approfondie en réponse à l'O<sub>3</sub>.

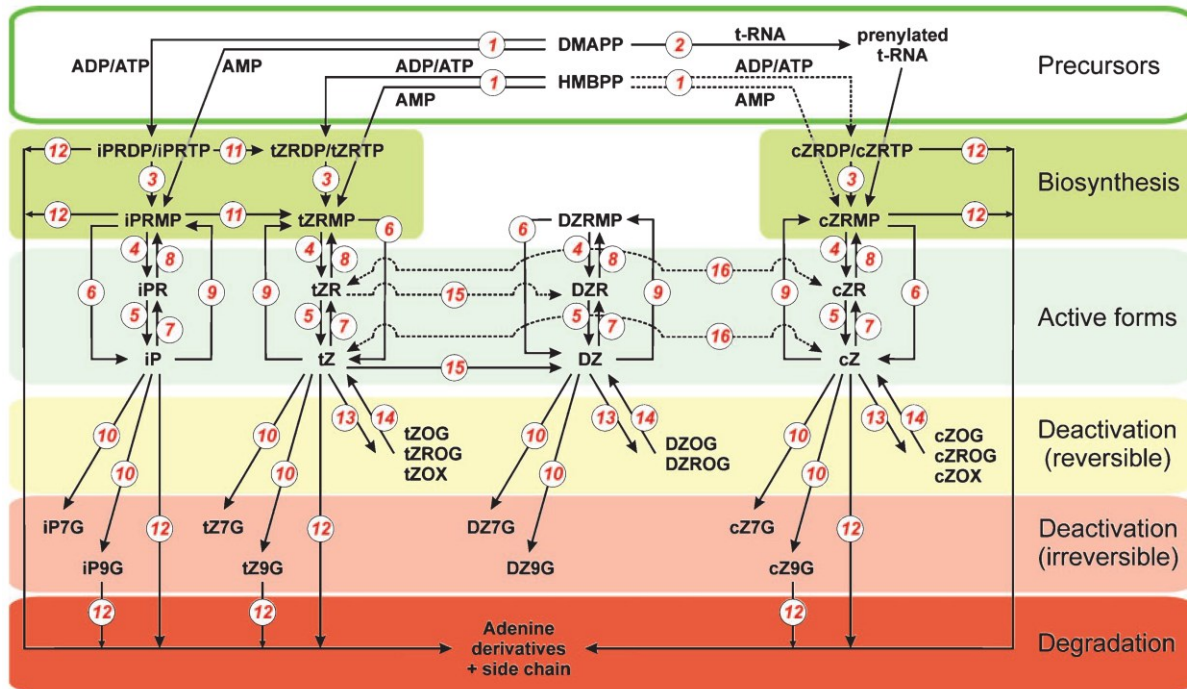


Figure 11 : Schéma présentant la synthèse, l'interconversion et la dégradation de CKs (Spíchal, 2012). Les numéros rouges renvoient aux enzymes impliquées dans l'interconversion des différentes formes. Les lignes pointillées représentent les voies qui ne sont pas suffisamment étudiées. (1) adenylate isopentenyl transferase (EC 2.5.1.27); (2) tRNA-specific isopentenyltransferase (EC2.5.1.8); (3) phosphatase (EC 3.1.3.1); (4) 5 $\alpha$ -ribonucleotide phosphohydrolase (EC 3.1.3.5); (5) adenosine nucleosidase (EC 3.2.2.7); (6) CK phosphoribohydrolase 'Lonely guy'; (7) purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1); (8) adenosine kinase (EC 2.7.1.20); (9) adenine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7); (10) *N*-glucosyl transferase (EC 2.4.1.118); (11) cytochrome P450 mono-oxygenase; (12) cytokinin dehydrogenase (EC 1.5.99.12); (13) zeatin-O-glucosyltransferase, either *trans*-zeatin- specific (EC 2.4.1.203) or *cis*-zeatin specific (EC 2.4.1.215), utilising xylose instead of glucose (EC 2.4.2.40); (14)  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21); (15) zeatin reductase (EC 1.3.1.69); (16) zeatin isomerase. DMAPP, dimethylallylpyrophosphate; HMBPP, 4-hydroxy-3- methyl-2-(*E*)-butenyl diphosphate; iPRDP, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine-5 $\alpha$ -diphosphate; iPRTP, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine-5 $\alpha$ -triphosphate; iPRMP, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine-5 $\alpha$ -monophosphate; iPR, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine; iP7G, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine-7-glucoside; iP9G, *N*<sub>6</sub>-isopentenyladenosine-9-glucoside, et leurs équivalents pour les formes tZ, DZ et cZ; tZOG, *trans*-zeatin-O-glucoside; tZROG, *trans*-zeatin-Oglucoside riboside et leurs équivalents pour les formes DZ et cZ; tZOX, *trans*-zeatin-O-xyloside; cZOX, *cis*-zeatin-O-xyloside.

### 1.2.6.2. Cytokinines

Les cytokinines (CKs) sont une famille de régulateurs de croissance (Vondráková et al., 2016). Environ 200 CKs ou régulateurs avec une activité cytokinique, naturelle ou synthétique ont été identifiés à ce jour (Spíchal, 2012). Ces molécules ont la même activité biologique que la zéatine (Zt, première CK découverte) et sont toutes composées d'une base adénine substituée (dérivé N6). Les CKs régulent la croissance des bourgeons, influencent les mécanismes de transport et les réponses à différents facteurs biotiques et abiotiques (Vondráková et al., 2016). Les CKs sont des retardateurs de sénescence, mais, paradoxalement, à hautes concentrations, ils peuvent bloquer la prolifération cellulaire et conduire à la mort cellulaire programmée (programmed cell death, PCD) (Carimi et al., 2003).

La voie de biosynthèse des CKs isoprénoïdes a été largement étudiée dans la littérature scientifique. Les chercheurs ont ainsi identifié différentes formes de CKs (Figure 11). Les précurseurs sont formés par la diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) et la 4-hydroxy-3-méthyl-2-(E)-butenyl diphosphate (HMBPP) couplées avec une adénine et seront triphosphates, puis monophosphates (PH). Une phosphatase permettra d'obtenir les formes actives, ribosides, puis les « free base » à l'aide d'une phosphohydrolase (5'-ribonucleotidophosphohydrolase). Les CKs glycosylées sont, quant à elles, des formes inactives. Par exemple, sous l'action de la zéatine-O-glucosyltransférase se forme une liaison réversible d'un glucose sur l'aglycone de la Zt, entraînant la création d'une forme de stockage nommée O-glucosides (OG), O-glucosides-xyloside (OX) ou riboside-O-glucosides (ROG). Outre cette O-glycosylation, les CKs peuvent former des isoformes irréversiblement inactifs (7G ou 9G) en étant N-glycosylées par une N-glycosyltransférase. Ces formes seront par la suite dégradées en dérivés d'adénine par la cytokinine déshydrogénase (Spíchal, 2012).

Une régulation importante des CKs sous sécheresse, salinité ou en réponse à l'adjonction d'une autre phytohormone, l'acide abscissique (ABA), ont également été constatée (Nishiyama et al., 2011; Tran et al., 2007; Vankova et al., 2010). Néanmoins, le rôle de ces phytohormones dans la résistance au déficit hydrique n'est pas encore totalement élucidé. En effet, les CKs peuvent exercer un rôle négatif dans la résistance au déficit hydrique : des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en CK se sont révélés avoir une meilleure résistance au déficit hydrique (Nishiyama et al., 2011). D'autres études sur du riz transgénique surexprimant l'isopentyl transférase (IPT) lié à la biosynthèse des CKs montre une amélioration de la résistance à la sécheresse et une augmentation du rendement (Peleg et al., 2011).

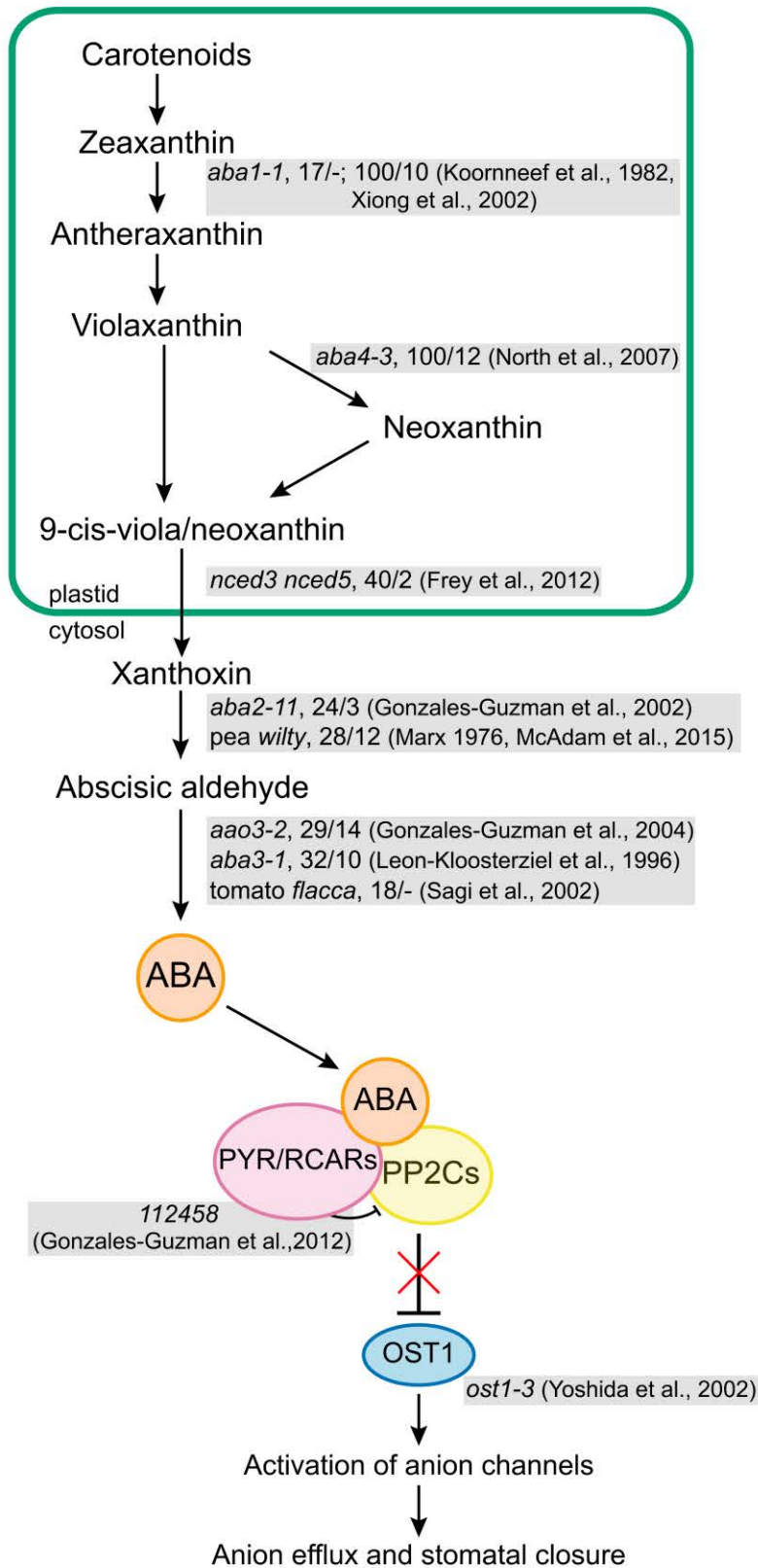


Figure 12 : Présentation schématique des voies de biosynthèse et de signalisation de l'ABA (Merilo et al., 2018).

De plus, des niveaux élevés de CK sous sécheresse retardent la sénescence foliaire (Kohli et al., 2013; Rivero et al., 2007; Tardieu, 2012). Les CKs et l'ABA (hormone associée au déficit hydrique) interagissent en fait de manière antagoniste, notamment sur le contrôle de l'ouverture/fermeture des stomates (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Pospíšilová et al., 2005). L'ABA est connue pour conduire à la fermeture des stomates tandis que les CKs à concentrations physiologiques participeraient à leur ouverture (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Le rôle des CKs dans la réponse de la plante au déficit hydrique reste donc à élucider avec précision, en particulier lors d'interaction avec les autres hormones stimulées par la sécheresse.

D'un autre côté, l'évolution des CKs sous stress O<sub>3</sub> est peu documentée. Une étude sur le hêtre montre une diminution du contenu foliaire en CK après une exposition à long terme (Winwood et al., 2007). Une autre expérience constate que l'ajout de tZ atténue les dégâts de l'O<sub>3</sub> sur les membranes de cotylédons de pois (Pauls & Thompson, 1982). L'utilisation de l'éthylène diurea (EDU) comme anti-ozonant avec une activité proche des CKs semble, quant à elle, jouer un rôle dans la protection des plantes (Lee et Chen 1982) via la stimulation de mécanismes antioxydants (Singh et al., 2015).

### **1.2.6.3. Acide abscissique**

L'ABA est impliqué dans le contrôle de la dormance et l'abscission des fruits et feuilles. Il joue également un rôle important en réponse au stress abiotique, notamment le déficit hydrique. En effet, la sécheresse stimule la biosynthèse d'ABA dans les feuilles et les racines (Pospíšilová et al., 2005). Dans les feuilles, l'ABA est synthétisé à partir des caroténoïdes (antioxydant lipophile), grâce à la scission par oxydation de 9-cis epoxy-caroténoïdes (zéaxanthine) en xanthoxine par l'enzyme 9-cis-epoxycaroténoïde dioxygénase (NCED) dans les plastides. Les xanthoxines sont ensuite converties en aldéhyde abscissique par l'enzyme xanthoxine oxydase, puis l'aldéhyde abscissique en ABA (Figure 12).

Or, le lien entre cette phytohormone et la fermeture des stomates sous stress oxydant due à l'O<sub>3</sub> et/ou sous sécheresse a été documenté (McAdam et al., 2017; Vahisalu et al., 2010, 2008; Wilkinson & Davies, 2010). L'ABA intervient donc dans la réponse de la plante au stress oxydant. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été reliée à la fermeture des stomates induite par l'ABA (Zhang et al., 2001).

#### 1.2.6.4. *Jasmonates*

Les jasmonates (JAs) regroupent l'acide jasmonique (JA) et ses dérivés. Ce sont des molécules essentielles de la signalisation. Elles appartiennent aux oxylipines et proviennent de l'oxygénation d'acides gras insaturés. Les JAs interviennent dans de nombreux processus développementaux et coordonnent également la réponse des végétaux à différents stress, biotiques et abiotiques (Kazan, 2015). La voie de biosynthèse de JA est amorcée par une première enzyme, la lipoxygénase (LOX), qui utilise l'oxygène moléculaire pour produire des hydroxyperoxydes à partir d'acides gras insaturés (Wasternack & Kombrink, 2009). Un point clé de la cascade de signalisation JA se situe au niveau des protéines JAZ, qui vont permettre la régulation de l'expression des gènes de réponse à JA. Brièvement, la forme bioactive de JA, la jasmonyl-isoleucine, va permettre la liaison des protéines JAZ à la protéine COI1, ce qui va entraîner la dégradation de JAZ par le protéasome, après ubiquitination de JAZ par SCFCOI1. Or, les protéines JAZ agissent comme des répresseurs de facteurs de transcription. Une fois JAZ dégradée, la répression est levée et ces facteurs de transcription vont réguler les réponses à JA en se liant à l'élément promoteur G-Box se trouvant au niveau des promoteurs des gènes de réponse à JA (Kazan, 2015; Kazan & Manners, 2012).

Or, dès le contact avec la feuille, l'O<sub>3</sub> et les ROS générés par celui-ci vont très vite avoir des effets au niveau des membranes cellulaires, entraînant notamment la peroxydation des lipides membranaires. Par conséquent, il apparaît légitime de se poser la question de l'implication de l'acide jasmonique (JA) dans la signalisation mise en place en réponse à l'O<sub>3</sub>. Chez les arbres, JA a été mis en évidence comme une importante molécule signalale s'exprimant en réaction au gaz. En effet, les niveaux endogènes de JA augmentent chez le peuplier ou chez le bouleau suite l'exposition à une concentration élevée d'O<sub>3</sub> (Koch et al., 1998; Vahala, 2003a) et *WIN3.7*, un gène marqueur de la signalisation médiée par les JA, est exprimé chez le peuplier (Koch et al., 1998). Dans la réponse à l'O<sub>3</sub>, JA jouerait donc au moins deux rôles : un dans la formation de lésions et l'autre dans le confinement de cette lésion (Kangasjärvi et al., 2005). L'activation notamment d'une voie de signalisation régulée par JA conduirait à la tolérance à l'O<sub>3</sub> (Koch et al., 1998).

De plus en plus d'études sur le rôle des JAs en cas de sécheresse émergent, signe que l'intérêt pour les JAs en condition de déficit hydrique augmente. Néanmoins, leur rôle est encore controversé (Riemann et al., 2015). Par exemple, chez le riz, JA pourrait activer des gènes liés à la tolérance, mais, en agissant en synergie avec l'ABA, également conduire à une diminution de la production de grains (Kim et al., 2009; Seo et al., 2011). L'application exogène de JAs

pourrait modifier la voie de l'ABA chez l'orge sous déficit hydrique (Bandurska et al., 2003). Les JAs interagissent cependant avec la voie de l'ABA via l'augmentation du flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Il en résulte une cascade de signalisation conduisant à la fermeture des stomates (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). En réponse à des stress biotiques ou abiotiques, JA semble plutôt être un acteur de la protection au stress, son rôle en réponse au déficit hydrique ou l' $\text{O}_3$  reste à éclaircir.

#### **1.2.6.5. Acide salicylique**

L'acide salicylique (SA), acide 2-hydroxy benzoïque, est un composé phénolique nommé d'après le Saule (*Salix*), dont l'écorce en est riche. SA intervient dans de nombreux processus, tels que la division cellulaire, la respiration, l'ouverture des stomates, la sénescence, la germination et le développement du plantule ainsi que dans la signalisation de certains stress abiotiques, notamment dans la thermo tolérance (Boatwright & Pajeroska-Mukhtar, 2013). La biosynthèse de SA peut avoir lieu par deux voies enzymatiques distinctes. Aucune des deux, cependant, n'est entièrement décrite (Janda & Ruelland, 2015). La première voie de biosynthèse implique l'enzyme Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), qui convertit la phénylalanine en acide trans-cinnamique. La seconde voie est caractérisée par une enzyme clé, l'Isochorismate Synthase (ICS), qui catalyse la conversion du chorismate en isochorismate. Les voies de biosynthèse et de signalisation liées à SA sont impliquées dans de nombreux stress, y compris oxydants (Janda & Ruelland, 2015).

#### **1.2.6.6. Éthylène**

L'éthylène est un gaz ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) qui joue un rôle majeur dans la maturation des fleurs et des fruits. Il est synthétisé par les plantes à partir de la méthionine présente dans la plupart des organes de la plante en réponse au stress. En raison de son état gazeux, l'éthylène se diffuse depuis son site de production. L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) est d'ailleurs un intermédiaire crucial de sa production et également parfois une forme de transport. Enfin, en réponse à des stress biotiques et abiotiques, l'éthylène peut conduire à la sénescence accélérée et à l'abscision des feuilles (Davies, 2004).

#### **1.2.6.7. « Cross-talk » hormonal sous stress oxydant**

Comme décrit précédemment, les phytohormones agissent simultanément et de façon coordonnée sur de nombreuses fonctions physiologiques. En réponse à l' $\text{O}_3$  et la sécheresse, de profondes modifications de l'homéostasie hormonale sont attendues, tout d'abord dans la triade JA, SA et ET. Celle-ci a en effet été identifiée comme un élément clé des mécanismes de réponse aux stress biotiques et abiotiques (Baier et al., 2005; Shigenaga & Argueso, 2016). Lors



du stress oxydant, JA, SA et l'éthylène sont des messagers secondaires importants. Ces trois hormones régulent la force du signal primaire en influant sur des cascades MAPK (Baier et al., 2005). SA, plus particulièrement, occupe une place centrale dans la réponse au stress oxydant, notamment à travers la protéine NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis Related 1). En effet, l'expression de nombreux gènes dépendant de cette phytohormone est régulée par NPR1, ce qui en fait un composant clé de la signalisation SA (Wang et al., 2005). NPR1 est présent sous forme d'oligomère dans le cytosol. En présence de SA et de changement de statut redox de la cellule, NPR1 passe sous forme de monomère (Janda & Ruelland, 2015). En ce qui concerne l'ET, sa production sous O<sub>3</sub> a été liée à l'accumulation de SA (Rao et al., 2002). L'adjonction de JA, cependant, supprime l'induction de la mort cellulaire produit par l'augmentation d'ET due à l'O<sub>3</sub> (Overmyer et al., 2000).

A cette triade s'ajoute l'ABA. Cette phytohormone intervient particulièrement dans le mécanisme de régulation des stomates. En cas de stress oxydant, la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne l'inhibition des protéines phosphatase 2C (PP2C), antagonistes de l'ABA (Meinhard & Grill, 2001). Or, l'augmentation de l'ABA en réponse au stress permet de déclencher le mécanisme de fermeture des stomates. Cependant, celui-ci peut être inhibé par la production d'ET, stimulée par l'O<sub>3</sub> (Wilkinson & Davies, 2010, 2009). En plus, la biosynthèse d'ET peut-être favorisée par les auxines et les CKs (Tanaka et al., 2006). Dès lors, la fermeture des stomates n'est pas systématique en cas de stress oxydant et dépend entièrement des phytohormones mobilisées dans la réponse. En effet, la régulation de l'ouverture/fermeture des stomates peut impliquer l'ensemble des phytohormones à des degrés différents et dépend de leur relation antagoniste ou synergique (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). De plus, cette régulation est dose-dépendante : IAA et CKs ouvrent les stomates à concentrations physiologiques mais les ferment à concentrations élevées. D'ailleurs, l'interaction entre l'IAA et les CKs pourrait être au cœur des modifications liées à la croissance sous stress et également prendre part à un « cross-talk » plus large responsable de la sénescence accélérée.

Pour finir, des modifications différentes de certaines voies sous sécheresse ou sous O<sub>3</sub> peuvent conduire à des modifications importantes de la signalisation sous stress. Des indices provenant de la modification, chez le chêne vert, du signal induit par l'O<sub>3</sub> sous sécheresse (Cotrozzi et al., 2017a) ou de la modification, chez *Leontodon hispidus*, de la fermeture des stomates induite par la sécheresse sous O<sub>3</sub> par modification de la voie de l'ABA (Wilkinson & Davies, 2009) semblent aller en ce sens. Ceci peut être dû à un effet antagoniste de l'ABA et des autres

hormones, notamment IAA et CKs (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Pospíšilová, 2003), stimulées différemment par l'O<sub>3</sub> et la sécheresse.

### **I.3. Analyse du risque causé par l'O<sub>3</sub> sur la végétation**

L'ensemble des mécanismes mis en œuvre de la détection du stress à la mise en place des défenses (détoxification et fermeture des stomates) pour faire face au déséquilibre homéostatique et permettre le maintien de l'intégrité cellulaire vont définir la capacité de la plante à survivre. Cependant, la « défense » va représenter un « coût carbone » non négligeable pour la plante, c'est-à-dire la perte de l'énergie normalement disponible pour la croissance ou la mise en réserve. Par conséquent, la survie de la plante va dépendre de ses capacités à maintenir son métabolisme carboné en vue de la mise en place de l'ensemble des mécanismes de défense. Les connaissances sur les réponses des arbres à leur environnement peuvent être utilisées pour établir une analyse de risque à travers l'évaluation de l'impact de l'O<sub>3</sub> en forêt. Pour réaliser cette évaluation, scientifiques et décideurs politiques ont choisi l'utilisation d'indicateurs et de seuils de risque. Le seuil de risque est la valeur d'un indicateur correspondant à une perte de biomasse supérieur à 10% (Sanders et al., 1995). Les indicateurs les plus simples sont seulement basés sur les concentrations d'O<sub>3</sub> moyennes ou cumulées. Aux États-Unis d'Amérique (USA), l'agence de protection environnementale (EPA) a initié le réseau NCLAN (The National Crop Loss Assessment Network). A l'issue de ce programme l'indice SUM (sum of all hourly average concentrations over  $X$  nmol.mol<sup>-1</sup>) a été choisi (Lefohn & Foley, 1992; Musselman et al., 2006). En Europe, la prise de conscience autour des risques liés aux polluants atmosphériques a donné lieu à la création de la « convention on land range and transboundary layer » en 1979 (Fuhrer et al., 1997). Le travail conjoint de la Commission économique pour l'Europe des Nations unies (UNECE) et de l'ICP Forêt (International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests) a conduit à la sélection de l'AOT40 (accumulated dose over a threshold of 40 ppb). Cet indice est utilisé par l'Union européenne via la directive (2008/50/CE) du 21 mai 2008. L'AOT 40 est défini comme la somme des différences entre les moyennes horaires et un seuil de 40 ppb, en annulant les moyennes horaires pour un éclaircissement énergétique minimum de 50 W.m<sup>-2</sup> (Kärenlampi & Skärby, 1996). Cet indice a été choisi pour sa simplicité et sa flexibilité permettant son application dans de multiples écosystèmes. Néanmoins, l'AOT40 n'intègre aucune information physiologique sur l'entrée d'O<sub>3</sub> dans les feuilles. Pour compenser ce manque, la communauté scientifique s'est orientée vers un indice prenant en compte le flux d'O<sub>3</sub> entrant dans les feuilles : le PODy (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of  $y$  nmol O<sub>3</sub> m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Cet indice a pris

plusieurs noms dans la littérature, dont AFstY (Accumulated stomatal flux above a threshold of Y nmol O<sub>3</sub>. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) et CUO (cumulative ozone uptake), qui correspond au POD<sub>0</sub>. Cet indice estime la concentration en ozone cumulée par moyenne horaire dans les feuilles et au-dessus d'un seuil de toxicité de Y nmol O<sub>3</sub> m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. L'objectif du POD<sub>Y</sub> est de couvrir des effets climatiques multifactoriels et les caractéristiques de la végétation (Anav et al., 2015). Actuellement, pour utiliser le POD<sub>Y</sub>, il est nécessaire de paramétrer des modèles de conductance stomatique reposant soit sur le modèle multiplicatif de Jarvis (Emberson et al., 2000b, 2018; Jarvis, 1976), soit sur le modèle Ball-Woodward-Berry (BWB) (Ball et al., 1987; Hoshika et al., 2017a; Tuzet et al., 2011). Cependant, pour compléter ces modèles, il reste à déterminer quelle part de l'O<sub>3</sub> entrant est neutralisée par la détoxication (Dizengremel et al., 2013). Le seuil de toxicité doit en effet représenter les capacités de détoxication de la plante. Actuellement, le seuil Y représentant la détoxication est seulement déterminé par la méthode du meilleur R<sup>2</sup>, soit le modèle qui s'ajustera le mieux aux données. Le modèle de Tuzet et al. (2011) intégrant l'entrée de l'O<sub>3</sub> par les stomates, la déposition du gaz sur les surfaces de la plante et des mécanismes de détoxication cellulaire liée à l'AsA pourraient permettre d'améliorer l'étude du risque. Comprendre le fonctionnement de la détoxication cellulaire est donc un enjeu majeur pour améliorer l'étude du risque lié à l'O<sub>3</sub>. Cette détermination efficace du risque dû à l'O<sub>3</sub> pour les arbres et, par extension, pour les peuplements forestiers dépend d'une multitude de facteurs, d'où l'importance d'étudier l'interaction de facteurs environnementaux (sécheresse, fort CO<sub>2</sub>...) et les mécanismes de défense mis en place par la plante, de manière à obtenir des modèles plus performants et plus réalistes.

#### **I.4. Problématique et objectifs de la thèse**

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans une continuité de recherches menées par notre laboratoire sur les effets de l'ozone et de la sécheresse sur la végétation. Les premières investigations ont eu lieu sur des conifères après des dommages attribués aux pluies acides à la fin des années 80. Rapidement, les recherches se sont recentrées sur l'O<sub>3</sub> et ont montré un contraste entre la diminution de photosynthèse et de la Rubisco d'une part et l'augmentation de la respiration et des enzymes des voies cataboliques d'autre part (Dizengremel et al., 1994; Dizengremel & Citerne, 1988; Dizengremel & Pétrini, 1994; Sehmer et al., 1998). Des résultats de plus en plus précis ont été obtenus grâce à l'utilisation de chambres phytotroniques permettant d'exposer de jeunes arbres à l'ozone et à la sécheresse. L'O<sub>3</sub> combiné à la sécheresse induit une modification de l'allocation de carbone chez le pin d'alep, *Pinus halepensis* (Gerant et al., 1996). L'O<sub>3</sub> est responsable de la diminution de l'activité Rubisco tandis que l'activité de l'enzyme cytosolique phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) augmente (Fontaine et al., 1999; Pelloux et al., 2001). Dans le même temps, les études sur l'épicéa et le hêtre en chambre à ciel ouvert dans les Vosges révèle une plus grande sensibilité de l'épicéa comparé au hêtre en condition de combinaison de stress (O<sub>3</sub> et sécheresse), principalement due à une perturbation de l'ouverture des stomates par l'O<sub>3</sub> (Dixon et al., 1998). Après les années 2000, les travaux du laboratoire se sont orientés sur l'étude du peuplier et montre la stimulation par l'O<sub>3</sub> de l'expression de l'alternative oxydase (AOX) mitochondriale (Dizengremel, 2001) et la synthèse de lignines condensées (Cabane et al., 2004). L'O<sub>3</sub> est responsable de différence de réponse entre feuille jeune et mature et il inhibe la photosynthèse et la photorespiration de manière coordonnée chez le peuplier (Bagard et al., 2008). L'analyse du protéome du peuplier a permis de confirmer l'impact de l'O<sub>3</sub> sur le cycle de Calvin (Bohler et al., 2007). Par la suite, le laboratoire sélectionnera deux génotypes de peupliers (« Carpaccio » et « Robusta ») pour différencier la réponse de tolérance à l'O<sub>3</sub>. Cette réponse pourrait être lié à une plus forte corrélation entre l'augmentation de l'activité de la PEPC et l'activité de deux NADP-déshydrogénases (Dghim et al., 2013) ainsi qu'un meilleur contrôle de la fermeture des stomates et à l'augmentation de la biosynthèse de GSH (Dumont et al., 2013, 2014b, 2014a). Ma thèse poursuit l'étude des deux génotypes de peupliers en réponse à l'O<sub>3</sub> et à la sécheresse. L'objectif de cette thèse est de participer à la compréhension de l'impact de la combinaison des facteurs environnementaux sur les réponses de défense des plantes. Cela représente en effet un enjeu majeur pour mieux appréhender leur capacité à faire face à un environnement changeant. **Pour cette raison, il est crucial de déterminer les acteurs clés intervenant dans les**

**mécanismes de réponse, voire de tolérance, à la combinaison de contraintes.** La régulation de la détoxification et de la conductance stomatique sont les deux processus identifiés qui agissent en tant que barrière à l'O<sub>3</sub> et à ses dérivés. Sous sécheresse, la fermeture des stomates permet de limiter les pertes en eau tandis que les processus de détoxification limitent le stress oxydant dû aux fuites d'électrons dans les chloroplastes. Comme évoqué précédemment, les modifications de ces processus ont déjà fait l'objet de nombreux travaux sous chacune des contraintes. Plus rares sont les études prenant en compte une combinaison de ces deux stress, voire leur succession temporelle. **L'objectif de la thèse est donc d'appréhender les réponses des arbres soumis à des contraintes environnementales qui peuvent être combinées ou successives.**

Lors d'une combinaison des épisodes d'ozone et de sécheresse, les effets de l'O<sub>3</sub> pourraient être atténués consécutivement à la fermeture des stomates causée par le déficit hydrique (Matyssek et al., 2006). Néanmoins en perturbant la fermeture stomatique, l'O<sub>3</sub> pourrait au contraire aggraver la perte en eau (Bohler, 2010; Pollastrini et al., 2014). De plus, la sécheresse entraîne, comme l'O<sub>3</sub>, un stress oxydant. La simultanéité des deux stress pourrait ainsi avoir un effet négatif synergique pour la plante ou bien un effet de tolérance croisée (Tausz et al., 2007). L'implication des voies de signalisation phytohormonales similaires mais régulées différemment en réponse aux deux contraintes pourrait être responsable de la modification de la réponse des plantes (Cotrozzi et al., 2017b; Wilkinson & Davies, 2009).

Les effets de la succession de stress sont encore moins documentés. Les mécanismes de défense mis en place pour pallier l'O<sub>3</sub> pourraient également intervenir par la suite lors de la sécheresse et rejoindre l'hypothèse de la tolérance croisée. L'exposition à l'O<sub>3</sub> permettrait ainsi, dans ce cas, une sorte d'acclimatation à la sécheresse. Toutefois, dans le cas d'un premier stress oxydant trop important, les mécanismes de défense de la plante pourraient faire défaut et se révéler inefficace pour contrer les effets d'une sécheresse soudaine.

La thèse s'attèlera donc à l'étude des trois grands axes de questionnement suivants :

- Comment peut être évaluée la sensibilité/tolérance à l'O<sub>3</sub> des deux géotypes de peupliers étudiés, Carpaccio et Robusta?
- Dans quelle mesure les mécanismes de réponse mis en place par le peuplier au niveau de la régulation stomatique et de la détoxification cellulaire sont-ils différents ou similaires face à ces deux contraintes, seules ou en combinaison ? les deux stress ont-ils un effet synergique ou antagoniste sur la plante ?

- Comment un épisode de pollution O<sub>3</sub> peut-il modifier la réponse de la plante à la sécheresse ? Dans quelle mesure les mécanismes de défense mis en place pour contrer l'O<sub>3</sub> peuvent-ils avoir un effet bénéfique sous sécheresse ou, au contraire, comment la plante peut-elle gérer les dégâts dus à l'O<sub>3</sub> lorsqu'elle subit ultérieurement un déficit hydrique ?

L'étude sera basée sur l'utilisation du peuplier comme arbre modèle et sur une approche intégrative à différentes échelles : de l'étude du transcriptome à l'arbre entier.



## **Chapitre II. Matériels et méthodes**

---



Notre étude s'appuie tout particulièrement sur le dispositif expérimental de fumigation d' $O_3$  situé à la Faculté des Sciences et Technologies de Nancy. Il permet l'étude en conditions contrôlées de jeunes plants soumis à des contraintes ozone et/ou fort  $CO_2$  (Figure 13). Avant le passage dans ces phytotrons, les plants sont mis à pousser dans des chambres de croissance qui auront les mêmes conditions d'éclairage, température et humidité que les phytotrons :  $23^\circ C/75\%$  le jour et  $20^\circ C/85\%$  la nuit, avec une photopériode de 14 heures. Cinq semaines après la plantation des boutures, les peupliers sont transférés en phytotrons. Après une semaine d'acclimatation, les arbres sont soumis à un traitement de fumigation d' $O_3$  et/ou de déficit hydrique du sol. Les conditions de culture des différentes expérimentations seront présentées par ordre chronologique (Tableau 1).

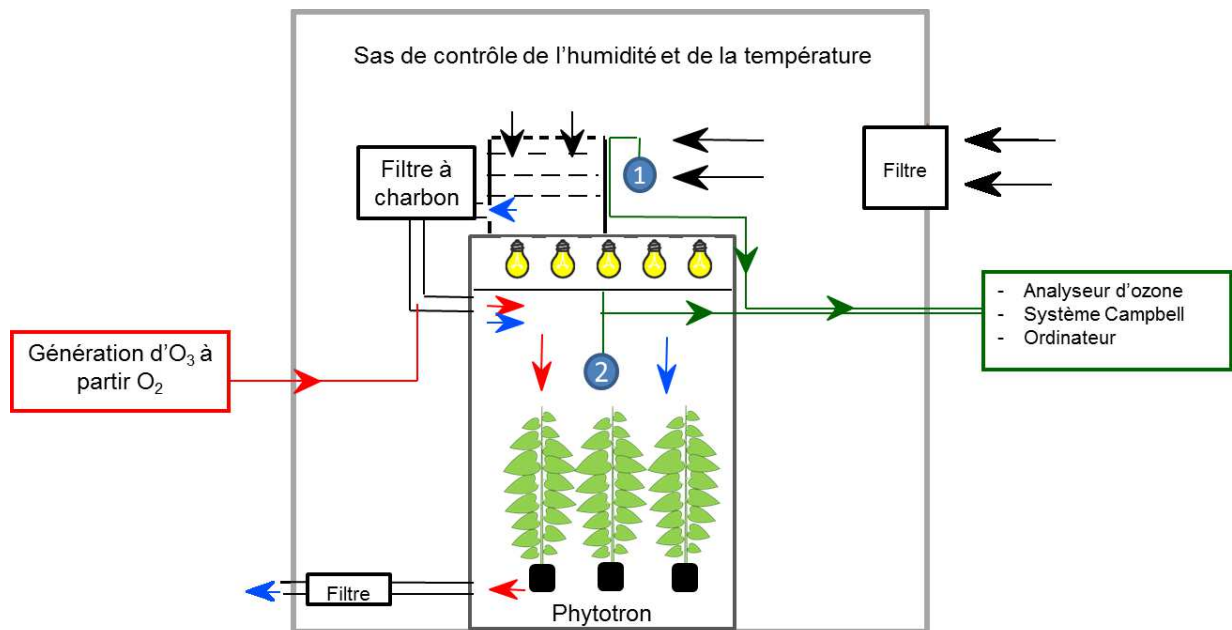


Figure 13 : Représentation schématique d'une chambre phytotronique. (1) Capteur d'humidité et (2) capteur de température et sonde  $O_3$ .

## II.1. Culture des peupliers

### II.1.1. Génotypes utilisés

Le peuplier est une plante modèle, notamment en biologie moléculaire, choisie pour sa croissance rapide et son génome entièrement séquencé en 2006 (Tuskan et al., 2006). C'est également une essence avec un fort intérêt économique pour la France qui en est le premier producteur européen. Deux génotypes de peuplier euraméricains (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) ont été choisis pour l'expérience : Robusta et Carpaccio. Ces deux cultivars ont été sélectionnés précédemment par le laboratoire pour la thèse de Dghim (2012) et Dumont (2013). Les différences entre les deux génotypes soumis à l'O<sub>3</sub> seront détaillées dans le Chapitre III. Pour toutes les expérimentations, les boutures ont été fournies par la pépinière forestière expérimentale de Guémené-Penfao en Loire-Atlantique.

### II.1.2. Conditions de fumigation O<sub>3</sub>

Le dispositif est constitué de huit chambres phytotroniques, dont la moitié est dédiée à la fumigation d'O<sub>3</sub>, alors que les quatre autres chambres constituent les chambres témoin, (air filtré). Les chambres de fumigation (Figure 13) font 1,2 m de côté pour 2 m de hauteur et la lumière est fournie par cinq lampes de culture de 400 watts (par chambre) (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas). L'air des huit chambres de culture est homogénéisé et humidifié dans un sas avant d'être réparti dans les phytotrons. L'O<sub>3</sub> est produit par un générateur (CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) à partir d'une bouteille d'oxygène. Les concentrations d'O<sub>3</sub>, la température et l'humidité sont surveillées en continu par un système Campbell et un ordinateur.

Tableau 1 : Résumé des expérimentations réalisées pendant le travail de thèse. Le taux relatif d'eau du sol extractible par la plante (Relative Extractable soil Water, REW) est calculé d'après Bogeat-Triboulot et al. (2007), par la relation suivante :

$$REW = \frac{(SWC - 2)}{(SWC_{cp} - 2)} \times 100$$

Le contenu en eau du sol (SWC, Soil volumetric Water Content) a été mesuré à l'aide d'une sonde TDR. L'humidité au point de flétrissement permanent est considérée égale à 2, et  $SWC_{cp}$ , SWC mesuré à capacité au champs.

Date	Génotype	Ozone	Sécheresse	Combinaison	Durée des traitements	Objectif principal
<b>2014</b> (M2)	Carpaccio Robusta	120 ppb 13h/jour	REW = 60 (7 jours) puis REW = 30 (10 jours)	simultanée	17 jours	Déterminer l'existence de réponses antioxydantes différentes
<b>2016</b> avril-mai	Robusta	120 ppb 13h/jour	REW =45 (11 jours)	simultanée	11 jours	Appréhender les mécanismes de signalisation hormonale
<b>2016</b> mai-juin	Robusta	80 ppb 13h/jour	REW = 30 (6 jours)	successive	21 jours	Expérimentation préliminaire pour l'étude de la succession de stress
<b>2017</b> janvier-avril	Robusta Carpaccio	80 ppb 13h/jour	REW = 45 (7 jours)	successive	21 jours	Étude de la dynamique d'ouverture/fermeture des stomates
<b>2018</b> mars-avril	Robusta Carpaccio	80 ppb à 200 ppb 13h/jour	Capacité au pots		12 jours	Comparaison des deux génotypes

### II.1.3. Expérimentation 1 - 2014 (Chapitre IV)

Pour avoir suffisamment de répétition par génotype et par traitement, les génotypes ont été cultivés en décalé de manière à d'abord réaliser l'expérience sur Robusta, puis sur Carpaccio. L'expérience comptabilise 64 plants par génotype, soit 8 plants par chambre phytotronique, répartis aléatoirement, dans chaque chambre, entre quatre traitements différents (WW :FA, WW :O<sub>3</sub>, D :FA, D :O<sub>3</sub>) (Figure 14). Cela représente 16 plants par traitement. Les peupliers bien hydratés et ceux soumis au déficit hydrique sont répartis de manière égale dans chaque chambre phytotronique. Quatre chambres sont dédiées au traitement O<sub>3</sub>. L'intensité de la fumigation d'O<sub>3</sub> (120 ppb pendant 17 jours, 13 h de fumigation par jour) a été choisie afin de nous placer dans des conditions équivalentes à celles des expérimentations menées précédemment au laboratoire (Dumont, 2013).

Les plantes soumises à la sécheresse sont irriguées de manière à avoir une humidité volumique du sol proche de 30 % durant les 7 premiers jours en phytotron. Puis l'humidité volumique du sol est amenée à 15 % pour les 10 derniers jours de l'expérimentation. Ces valeurs correspondent respectivement à un REW de 60% et 30%.

Lors de cette expérimentation, des prélèvements de feuilles ont été réalisés à 2, 11 et 17 jours de traitements pour des analyses de dosage des pools oxydés et réduits de l'ascorbate et du glutathion, des activités enzymatiques liées au cycle ascorbate-glutathion et pour suivre l'expression des gènes codant ces enzymes.

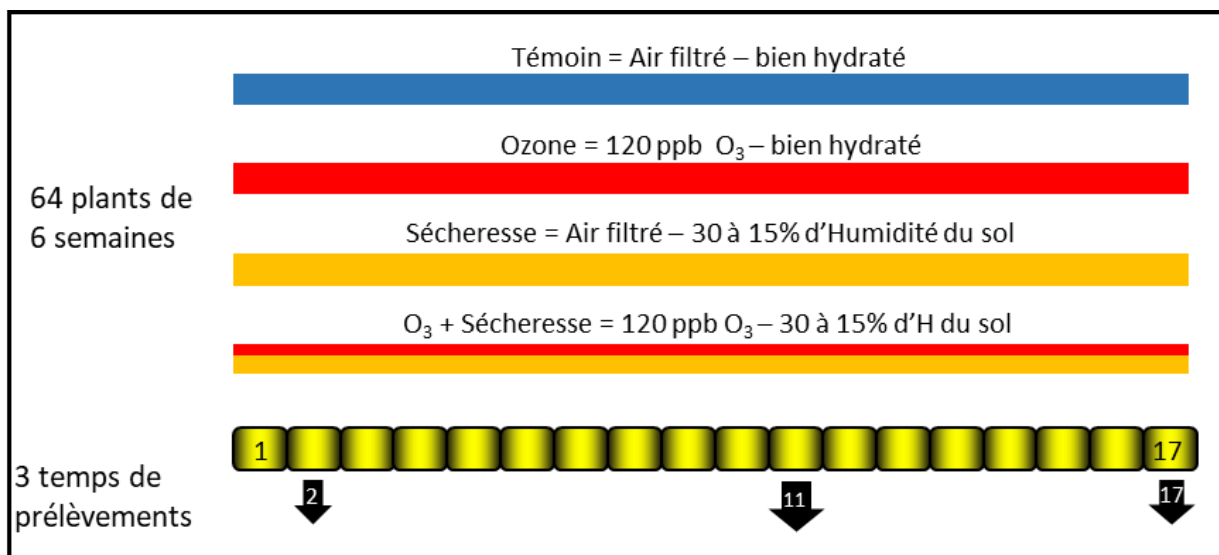


Figure 14 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 génotypes séparément lors de l'expérimentation de 2014. Les prélèvements ont été réalisés à 2, 11 et 17 jours.

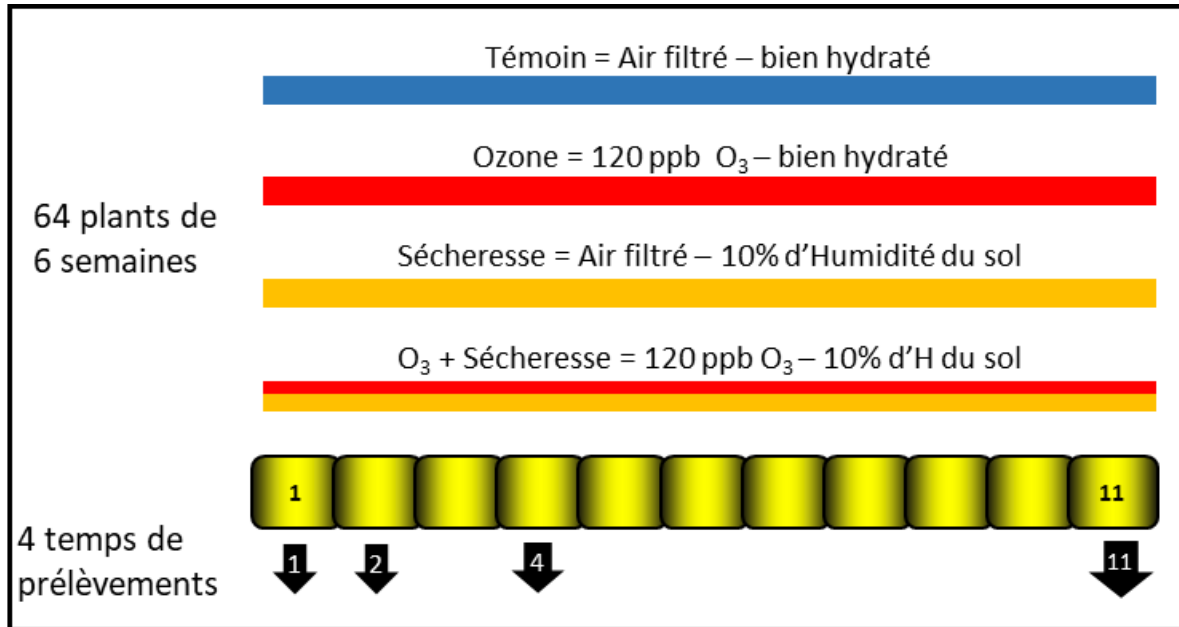


Figure 15: Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes séparément lors de l'expérimentation de 2016. Les prélèvements ont été réalisés à 1, 2, 4 et 11 jours après l'initiation des traitements.

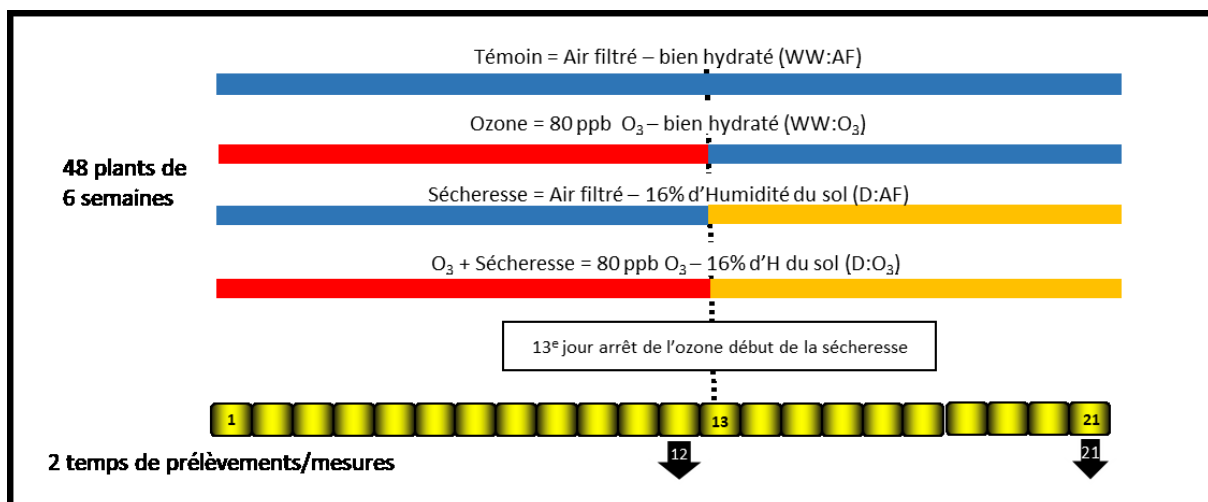


Figure 16 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 géotypes séparément lors de l'expérimentation de janvier à avril 2017. Les mesures d'échanges gazeux ont été réalisées à 12 et 21 jours.

#### **II.1.4. Expérimentation 2 - 2016 (Chapitre IV)**

Lors de la première année de thèse, une expérimentation sur le génotype Robusta a été mise en place. L'objectif principal était de déterminer quels étaient les acteurs de la signalisation hormonale mise en place lors de l'initiation du stress dû à l'O<sub>3</sub> et/ou sécheresse.

Comme vu précédemment, 64 arbres sont utilisés pour cette expérimentation et répartis dans les 8 chambres de fumigation. Pour la sécheresse, la cible était d'atteindre un REW de 45 % dès le premier jour de fumigation (Figure 15). Des prélèvements ont été réalisés à 1, 2, 4 et 11 jours après l'initiation des traitements pour réaliser un profilage phytohormonal décrit en partie II.2.3.2.b. Le 1<sup>er</sup> jour, les prélèvements ont été effectués après 10 h de fumigation. Pour les jours 2, 4 et 11, ils ont eu lieu au milieu de la photopériode (7h de lumière), après 6 h de fumigation.

#### **II.1.5. Expérimentation 3 - 2017 (Chapitre V)**

Cette expérimentation réalisée entre janvier et avril 2017 vise à reproduire la succession naturelle d'élévation des concentrations d'O<sub>3</sub> au printemps et des sécheresses estivales (Monks, 2000; Pollastrini et al., 2014). Suite à une expérimentation préliminaire réalisée en mai 2016 sur le génotype Robusta (Tableau 1), nous avons décidé de diminuer la concentration d'O<sub>3</sub> avec le passage à une dose chronique d'O<sub>3</sub> de 80 ppb durant 13 heures par jour. Pour cette expérimentation, les deux génotypes, Carpaccio et Robusta, ont été étudiés : les arbres ont été exposés à l'O<sub>3</sub> pendant 13 jours, puis à la sécheresse uniquement pendant 8 jours supplémentaires (Figure 16). Les arbres ont été plantés dans des pots de 10 L contenant un mélange de sable et de tourbe (50:50, v:v) et 15 g de nutricote T-100 (N/P/K 13/13/13, Fertil, France). Pour compenser la différence de hauteur entre les arbres, le génotype Carpaccio a eu une période de développement avant traitement de 5 semaines contre 6 semaines pour le génotype Robusta. Dans les pots destinés à la sécheresse, les niveaux d'humidité du sol étaient suivis à l'aide de 24 sondes TDR sans fil (CWS655E, Campbell Scientific Ltd, Antony, France) fournissant une mesure toutes les 30 minutes. Le niveau de sécheresse appliqué a été choisi pour coïncider avec le niveau d'humidité du sol correspondant à l'observation de l'enclenchement de la fermeture des stomates sur les deux génotypes. Pour Carpaccio et Robusta, le pourcentage d'humidité du sol était respectivement de 18 % et de 17 % ce qui correspond à un REW de  $45 \pm 1$  %.

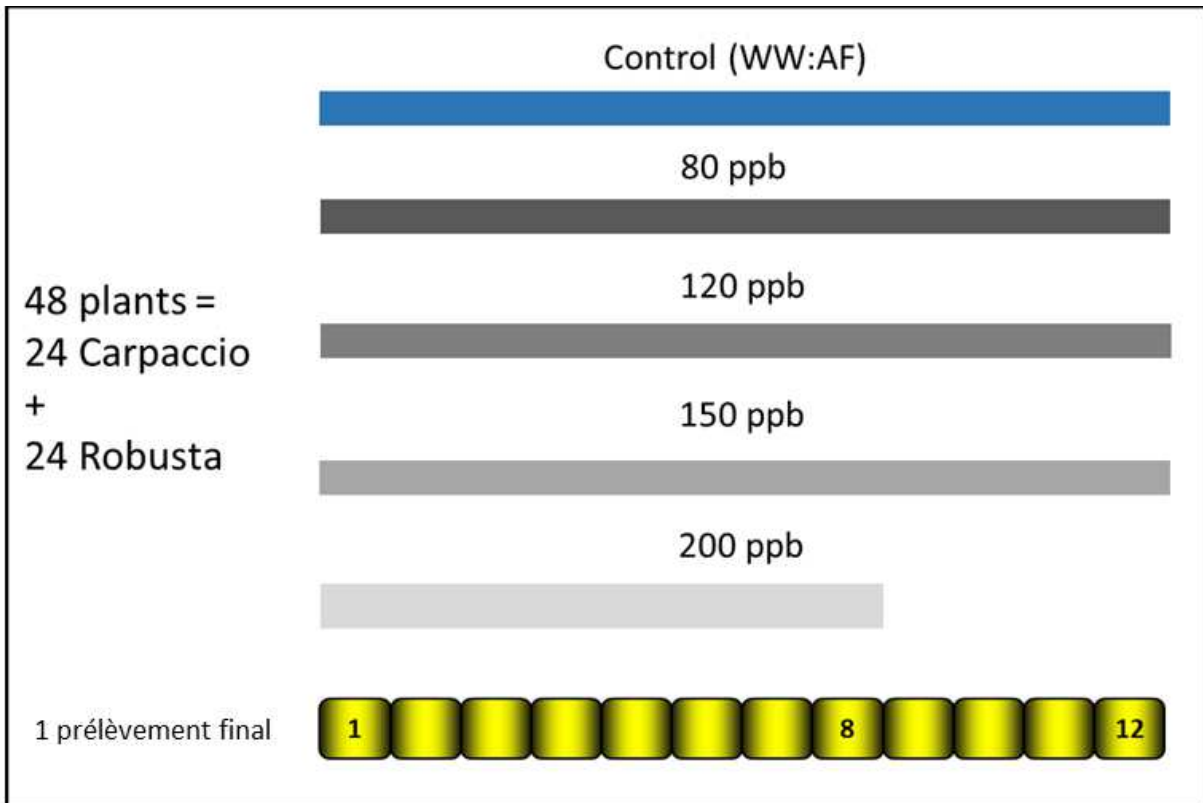


Figure 17 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les 2 génotypes lors de l'expérimentation de mai-juin 2018. Les arbres soumis au traitement 200 ppb ont été prélevés après 8 jours de fumigation à cause de dégâts trop importants, tandis que les traitements 80, 120 et 150 ppb ont été prélevés à 12 jours.

### II.1.6. Expérimentation 4 - 2018 (Chapitre III)

Pour cette expérimentation, nous disposons de 48 plants, soit 24 plants Carpaccio et 24 plants Robusta issus de boutures. Ils ont été plantés dans des pots de 10 L avec du terreau (N/P/K 14/16/18, 1. 2kg.m<sup>-3</sup>, Gramoflor SP1 Universel). Pour un bon drainage, des billes d'argile ont été déposées au fond des pots et 15 mg de Nutricote T-100 (N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France) ont été ajoutés pour fertiliser le milieu. Cinq semaines après la mise en culture, la première étape a été l'acclimatation des peupliers aux chambres phytotroniques avant le début du traitement O<sub>3</sub>. Cela a duré une semaine. Au total, six chambres phytotroniques ont été utilisées pour l'expérimentation : deux sont des chambres témoins, avec de l'air filtré, et quatre sont dédiées au traitement O<sub>3</sub> avec des concentrations croissantes de 80, 120, 150 et 200 ppb pendant 13 h par jour (le déclenchement de l'O<sub>3</sub> a lieu une heure après le début de la photopériode). Dans chaque chambre, il y avait quatre répétitions biologiques des deux génotypes, soit 8 arbres par chambre. Chaque matin, les plants étaient arrosés à capacité aux pots. L'expérimentation s'est déroulée sur douze jours.

La feuille suivie est la première feuille pleinement développée (à partir de l'apex). Elle doit être située au même niveau entre les individus d'un même génotype pour comparer des feuilles exposées à une même quantité de lumière. Ainsi, pour Robusta, la feuille suivie est la 9<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> et pour Carpaccio, la 12<sup>e</sup> ou 13<sup>e</sup> depuis le bourgeon apical. Pour compenser la différence de taille entre les deux génotypes, les plants du génotype Robusta ont été surélevés de 40 cm.



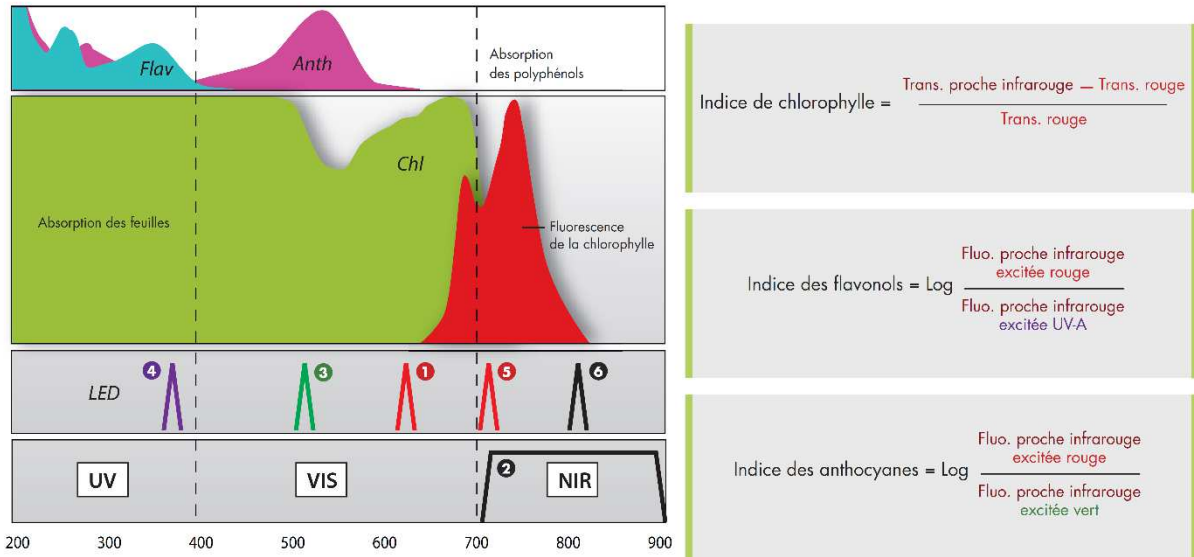


Figure 18 : Principe de mesure des pigments photosynthétiques par le Dualox d'après la plaquette d'utilisation.

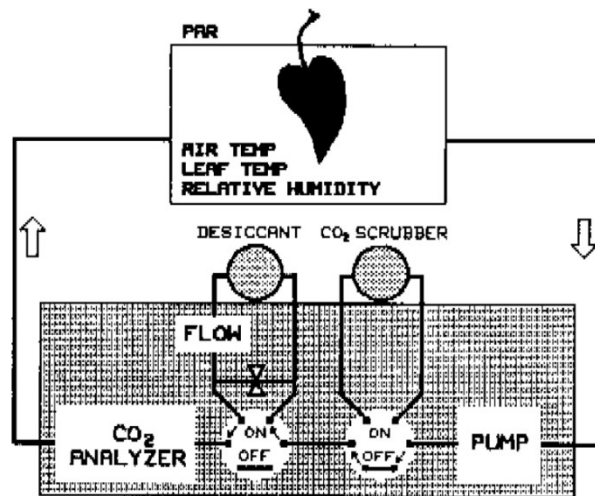


Figure 19 : Mesure de la conductance et de l'assimilation par le Li-Cor 6200 et principe de l'appareil issu du manuel du constructeur.

## II.2. Paramètres suivis

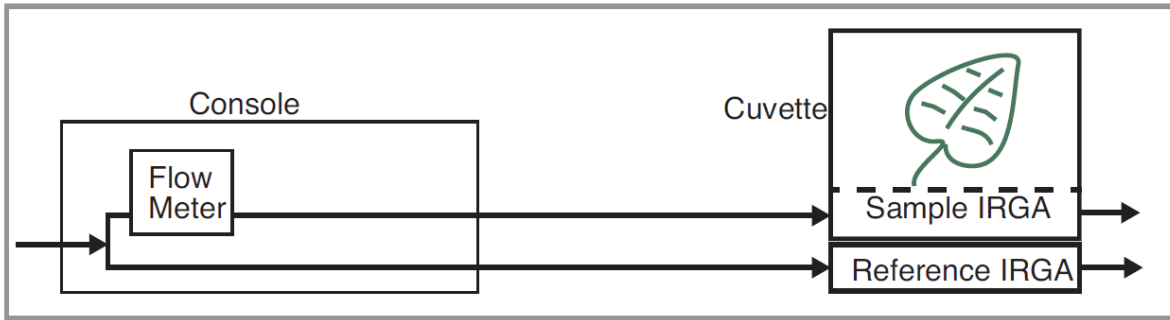
### II.2.1. Paramètres de croissance

La hauteur, le diamètre et le nombre de feuilles ont été caractérisés pour chaque arbre tous les 2-3 jours du début à la fin de chaque expérimentation. La hauteur a été mesurée à l'aide d'un mètre ruban de la base de la tige au niveau de la bouture jusqu'à l'apex. Pour le diamètre, des mesures au pied à coulisse ont été réalisées à environ 1,5 cm de la base de la tige. Le nombre de feuilles sur l'arbre a été compté de la feuille la plus basse à la dernière feuille décollée de l'apex. Les feuilles tombées dans le pot ont également été comptées et considérées comme de la biomasse perdue. Par ailleurs, en fin d'expérimentation, les arbres ont été coupés pour déterminer la biomasse. La masse fraîche (MF) des feuilles a été déterminée au moment de l'abattage, puis la masse sèche après quatre jours à l'étuve, réglée à 75 °C. De la même manière, la MF des tiges a été déterminée après division de celles-ci en tronçon d'environ 5 cm, mais après 10 jours de séchage. Le lavage des racines ne permettant pas de déterminer de masse fraîche, ces dernières ont séché pendant 10 jours à 75 °C avant d'être pesées.

### II.2.2. Mesure non destructives des pigments photosynthétiques

Les teneurs en chlorophylles, anthocyanes et flavonols ont été déterminées à l'aide d'un Dualex (Force-A, Orsay, France), utilisé sur les mêmes feuilles sur lesquelles ont été mesurés les échanges gazeux. La mesure de ces teneurs a été réalisée en prenant soin d'éviter les nervures importantes de la feuille. Concernant les résultats obtenus, l'appareil permet d'obtenir 3 indices correspondant aux teneurs en chlorophylles (proportionnel à une teneur en  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ), flavonols et anthocyanes (Figure 18). La fluorescence chlorophyllienne proche infrarouge (2) est mesurée grâce à une première excitation référence (1) non absorbée par les polyphénols. Elle est comparée à une seconde excitation sonde spécifique d'un type particulier de polyphénols (ex. : vert (3) pour les anthocyanes ou UV-A (4) pour les flavonols). Une partie seulement de cette lumière atteint la chlorophylle dans le mésophylle et peut générer de la fluorescence proche infrarouge. La chlorophylle des feuilles peut être estimée rapidement et précisément à partir de leur transmission. Une première longueur d'onde située très proche du rouge (5) quantifie la chlorophylle et une seconde située dans le proche infrarouge (6) permet de prendre en compte les effets de structure de la feuille.

LI-6400XT



$$\text{Photo} = \frac{\text{Flow} \times \Delta\text{CO}_2}{\text{Area}}$$

$$\text{Trans} = \frac{\text{Flow} \times \Delta\text{H}_2\text{O}}{\text{Area}}$$

Figure 20 : Schéma du système ouvert issu du manuel d'utilisation du Li-6400XT. La photosynthèse et la transpiration sont déterminées à partir des différences en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O entre la chambre de mesure (« sample IRGA ») et les conditions de référence avant la chambre (« reference IRGA »).

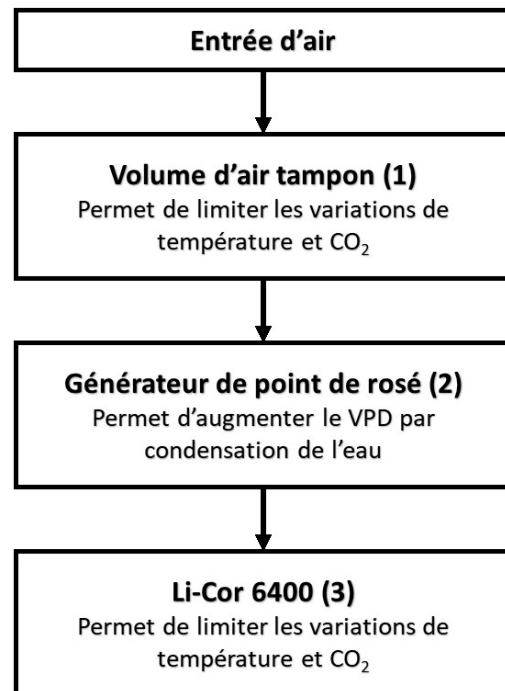
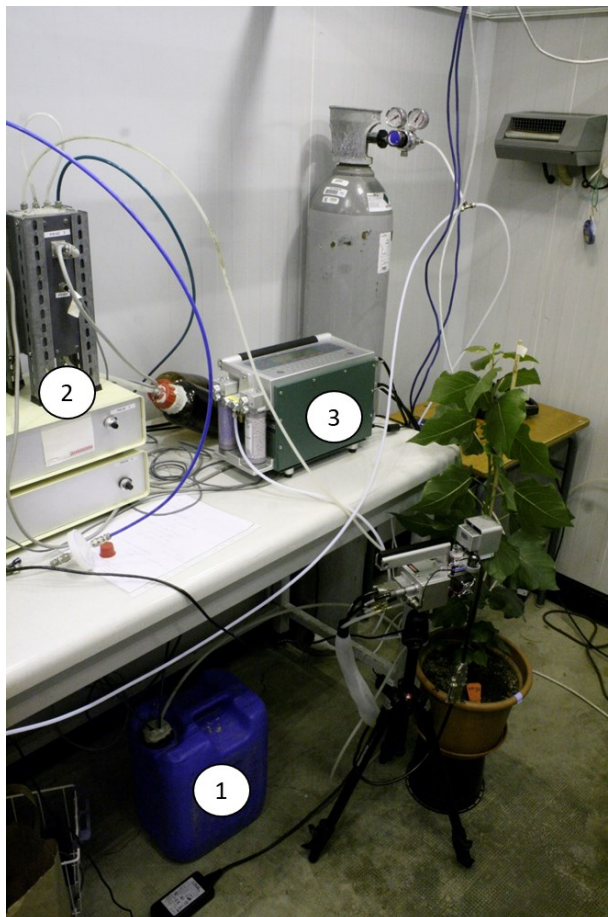


Figure 21: Schéma du dispositif pour les courbes de réponse au VPD.

### II.2.3. Mesure des échanges gazeux

#### II.2.3.1. Cinétique de mesure instantanée

Des mesures d'échanges gazeux foliaires instantanés ont été réalisées à l'aide d'un Li-6200 (Li-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA) pour déterminer la conductance stomatique à la vapeur d'eau ( $g_s$ ) et l'assimilation nette de  $CO_2$  ( $A_n$ ). Le flux d'air dans la chambre est de  $450 \mu\text{mol}^{-1}$ . La mesure est prise après 30 secondes de stabilisation. Le Li-6200 est équipé d'une pompe qui va faire passer l'air de la chambre dans un analyseur de  $CO_2$  avant de le retourner dans la chambre, on parle de circuit fermé (Figure 19). Le Li-6200 mesure la différence de concentration en  $CO_2$  dans la chambre au cours des 30 secondes. Ceci permettra de calculer l'assimilation en prenant en compte d'autres facteurs tels la surface de la feuille, la pression atmosphérique, la température. La conductance stomatique est calculée grâce à la variation d'humidité dans la chambre au cours du temps qui est dû à la transpiration. Le calcul prend également en compte des facteurs tels que la pression de vapeur dans la chambre, la température de l'air et de la feuille et la conductance de couche limite.

$A_n$  et  $g_s$  permettent de calculer l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau ( $WUE_i$ ) grâce à la formule suivante :  $WUE_i = A_n/g_s$ .

#### II.2.3.2. Courbe de réponse d'ouverture/fermeture des stomates

##### II.2.3.2.a. Principe de l'appareil utilisé

L'appareil portable Li-6400XT (Li-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA) est un système ouvert permettant de réaliser des mesures d'échanges gazeux sans distinction de face. La feuille est placée dans une chambre de mesure à l'intérieur de laquelle les paramètres environnementaux peuvent être contrôlés : l'intensité et la qualité de la lumière, la température et la composition en  $CO_2$  et vapeur d' $H_2O$  de l'air (Figure 20). Les concentrations en  $H_2O$  et  $CO_2$ , le rayonnement quantique, la température de bloc, de l'air et de la feuille, le débit d'air et la pression sont mesurés de manière simultanée à l'aide de toute une série de capteurs majoritairement groupés au niveau de la chambre de mesure : deux IRGA (analyseur de gaz à infrarouge) pour les concentrations d' $H_2O$  et de  $CO_2$ , un capteur Quantum sensor Li 190 pour la lumière extérieure, un capteur GaAsP pour la lumière à l'intérieur de la chambre, une thermistance pour la température de bloc et d'air, un thermocouple pour la température de feuille, un capteur de flux pour le débit d'air et un capteur de pression (les deux dernières dans la console).

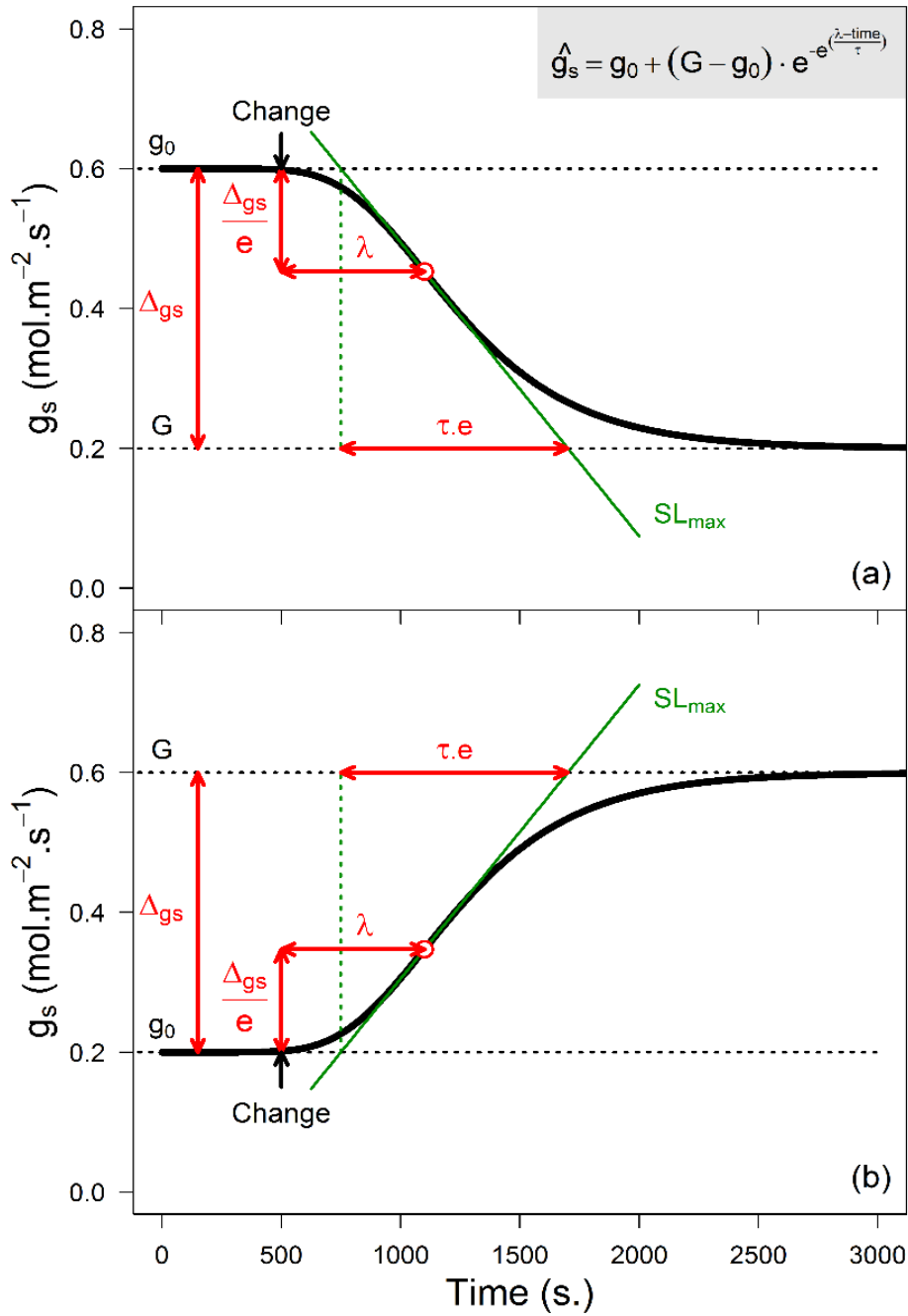


Figure 22: Résumé des paramètres dérivés de l'ajustement au modèle sigmoïdal. (a) Lors de la fermeture des stomates et (b) lors de l'ouverture des stomates. La flèche noire montre le temps à partir duquel intervient le changement d'éclairement ou de VPD.  $g_0$  et  $G$  représentent les états stables au début et à la fin de la courbe de réponse.  $\Delta g_s$  est la différence entre  $g_0$  et  $G$  et traduit l'amplitude du changement.  $\lambda$  est le temps entre la modification environnementale (lumière ou VPD) et le moment où le changement de  $g_s$  est à son maximum (point blanc). La pente maximum,  $SL_{\max}$ , est tangente à ce point (figure complémentaire issue de Durand et al., 2019).

### II.2.3.2.b. Courbe de réponse des stomates à la lumière et au VPD

Quatre appareils de mesure de la photosynthèse portables Li-6400XT (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) intercalibrés ont été utilisés pour mesurer la réponse des stomates à la lumière et au déficit de pression de vapeur d'eau (VPD). Ces appareils permettent de contrôler les paramètres environnementaux à l'intérieur de la chambre de mesure foliaire de 2 cm<sup>2</sup> (Li-6400-40).

Premièrement, les feuilles sont acclimatées aux conditions fixées à l'intérieur de la chambre de mesure (PAR: 800  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de bleu, la concentration en CO<sub>2</sub> est de 400 ppm, pour une température foliaire de 25 °C, un VPD de 0.8 kPa et un flux d'air de 600  $\mu\text{mol.s}^{-1}$ ) jusqu'à ce que la conductance stomatique ( $g_s$ ) se stabilise ( $g_0$  définie par une variation de  $\pm 5\%$  pendant 5 minutes). A ce moment, le PAR et les lumières de la chambre de culture sont éteints et la  $g_s$  est enregistrée toutes les 45 secondes jusqu'à atteindre un nouvel état stable ( $g_1$ ). Ensuite, la lumière dans la chambre et le PAR sont rallumés (800  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dans la chambre de mesure) jusqu'à ce que  $g_s$  atteigne un dernier état stable ( $g_2$ ). La même méthode est appliquée pour la fermeture des stomates en réponse à un changement de VPD de 0.8 kPa à 3 kPa avec le PAR fixé à 800  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La modification du VPD est obtenue grâce à un générateur de point de rosée (Figure 21).

### II.2.3.2.c. Analyse des courbes de réponse

Les courbes de réponse obtenues sont analysées à l'aide du modèle de réponse sigmoïdale suivant (Violet-Chabrand, 2013) :

$$\hat{g}_s = g_0 + (G - g_0) e^{-e^{\left(\frac{\lambda-t}{\tau}\right)}}$$

$\hat{g}_s$  est la conductance prédite,  $g_0$  et  $G$  sont respectivement les états stables de  $g_s$  ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) au début et à la fin de la courbe,  $\tau$  une constante temporelle (s),  $\lambda$  le temps pour atteindre le point d'inflexion (s) and  $t$  le temps (s). À partir de ces paramètres, un estimateur de la vitesse de réponse des stomates, la pente maximum (*the maximum slope*,  $SL_{max}$ ), peut être calculé comme suit:

$$SL_{max} = \frac{G - g_0}{\tau \cdot e}$$

( $G-g_0$ ) représente la variation de la réponse des stomates, avec  $e$  le nombre d'Euler ( $e \approx 2.718$ ). La procédure d'ajustement du modèle utilise la fonction *nlinb* de R (R Core Team, 2017) avec des valeurs de départ uniformes pour  $\tau$  et  $\lambda$ . L'ensemble des paramètres est représenté sur la Figure 22. Des informations complémentaires sur le modèle peuvent être trouvées dans Durand et al., 2019b; Gérardin et al., 2018; Violet-Chabrand, 2013.

Tableau 2 : Noms et abréviations des phytohormones pouvant être déterminées lors du profilage hormonal. Les fractions A et B correspondent aux fractions acide et basique respectivement.

<b>Fraction A</b>				<b>Fraction B</b>			
	Abreviation	Formule	MW		Abreviation	Formule	MW
<b>Auxins</b>				<b>Cytokinins</b>			
indole-3-acetic acid	IAA	C10H9N1O2	175.19	trans-zeatin	tZ	C10H13N5O1	219.25
IAA-glucose ester	IAA-GE	C16H19N1O7	337.33	trans-zeatin riboside	tZR	C15H21N5O5	351.37
IAA-alanine	IAA-Ala	C13H14N2O3	246.27	trans-zeatin-7-glucoside	tZ7G	C16H23N5O6	381.39
IAA-aspartate	IAA-Asp	C14H14N2O5	290.28	trans-zeatin-9-glucoside	tZ9G	C16H23N5O6	381.39
IAA-glutamate	IAA-Glu	C17H20N2O5	332.36	trans-zeatin-O-glucoside	tZOG	C16H23N5O6	381.39
IAA-leucine	IAA-Leu	C16H20N2O3	288.35	trans-zeatin riboside -O-glucoside	tZROG	C21H31N5O10	513.51
IAA-tryptophane	IAA-Trp	C21H19N3O3	361.4	trans-zeatin riboside monophosphate	tZRMP	C15H22N5O8P1	431.34
IAA-valine	IAA-Val	C15H18N2O3	274.32	cis-zeatin	cZ	C10H13N5O1	219.25
IAA-Phenylalanine	IAA-Phe	C19H18N2O3	322.37	cis-zeatin riboside	cZR	C15H21N5O5	351.37
oxo-IAA	OxIAA	C10H9N1O3	191.19	cis-zeatin-9-glucoside	cZ9G	C16H23N5O6	381.39
oxo-IAA-glucose ester	OxIAA-GE	C16H19N1O6	353.33	cis-zeatin-O-glucoside	cZOG	C16H23N5O6	381.39
Indole-3-acetamide (IAA precursor)	IAM	C10H10N2O1	174.2	cis-zeatin riboside -O-glucoside	cZROG	C21H31N5O10	513.51
Indole-3-acetonitrile (IAA precursor)	IAN	C10H8N2	156.19	dihydrozeatin	DZ	C10H15N5O1	221.26
4-chloro-IAA	4Cl-IAA	C10H8Cl1N1O2	209.63	dihydrozeatin riboside	DZR	C15H23N5O5	353.38
indole-3-butyric acid	IBA	C12H13N1O2	203.24	dihydrozeatin-7-glucoside	DZ7G	C16H25N5O6	383.41
Phenylacetic acid	PAA	C8H8O2	136.15	dihydrozeatin-9-glucoside	DZ9G	C16H25N5O6	383.41
<b>Abscisic acid</b>				dihydrozeatin-O-glucoside	DZOG	C16H25N5O6	383.41
abscisic acid	ABA	C15H20O4	264.32	dihydrozeatin riboside -O-glucoside	DZROG	C21H33N5O10	515.52
ABA-glucose ester	ABA-GE	C21H30O9	426.47	dihydrozeatin riboside monophosphate	DZRMP	C15H24N5O8P1	433.3
phaseic acid	PA	C15H20O5	280.31	isopentenyl adenine	iP	C10H13N5	203.25
dihydrophaseic acid	DPA	C15H22O5	282.3	isopentenyl adenosine	iPR	C15H21N5O4	335.37
7-hydroxy-ABA	7OH-ABA	C15H20O5	280.32	isopentenyl adenine-7-glucoside	iP7G	C16H23N5O5	365.39
9-hydroxy-ABA	9OH-ABA	C15H20O5	280.32	isopentenyl adenine-9-glucoside	iP9G	C16H23N5O5	365.39
Neophaseic acid	NeoPA	C15H22O5	282.3	isopentenyl adenosine monophosphate	iPRMP	C15H22N5O7P1	415.3
<b>Brassinosteroids</b>				2-methylthio isopentenyl adenosine	iPR-MeS	C16H23N5O4S1	381.46
Brassinolide	Br	C28H48O6	480.69	2-methylthio zeatin riboside	ZR-MeS	C16H23N5O5S1	397.46
Castasterone	Bk	C28H48O5	464.69	<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid</b>			
<b>Salicylic acid</b>	SA	C7H6O3	138.12	ACC	C4H7N1O2	101.1	
<b>Benzoic acid</b>	BzA	C7H6O2	122.12				
<b>Strigol</b>	Strigol	C19H22O6	346.38				
<b>Jasmonates</b>							
jasmonic acid	JA	C12H18O3	210.28				
JA-isoleucine	JA-ILE	C18H29N1O4	323.44				
cisOPDA (JA precursor)	cisOPDA	C18H28O3	292.42				
<b>Gibberellin</b>							
	<b>Gan</b>						
	GA1	C19H24O6	348.4				
	GA3	C19H22O6	346.38				
	GA4	C19H24O5	332.4				
	GA7	C19H22O5	330.38				
	GA8	C19H24O7	364.4				
	GA19	C20H26O6	362.43				
	GA20	C19H24O5	332.4				
	GA29	C19H24O6	348.4				

### **II.2.4. Phytohormones**

En collaboration avec Eric Ruelland (IEES, Université Paris Créteil) et Petre Dobrev, (Laboratory of Hormonal Regulations in Plants, Prague, Cz), nous avons pu réaliser un profilage hormonal pour l'expérimentation 2 présentée en section II.1.4 et dans le Chapitre IV. Pour cela, des échantillons de 100 mg de poudre de feuilles de peupliers lyophilisées ont été envoyés à Prague au Laboratory of Hormonal Regulations in Plants. Les phytohormones ont été extraites (Tableau 2), purifiées et quantifiées en accord avec des travaux précédemment publiés par leur équipe (Dobrev & Kaminek, 2002; Dobrev & Vankova, 2012). Brièvement, les échantillons ont été homogénéisés au broyeur à bille (MM301, Retsch) et des isotopes marqués ont été ajoutés comme standards internes. L'extraction a eu lieu à - 20 °C avec une préparation de méthanol/eau/acide formique (15/4/1 v/v/v). Les extraits ont été purifiés sur des colonnes d'extraction en phase solide (Oasis-MCX, Waters). Les 2 fractions de phytohormones, acide et basique, obtenues ont été analysées séparément par HPLC (Ultimate 3000, Dionex), couplé à un spectromètre de masse hybride triple quadripolaire/piège à ions (3200 Q TRAP, Applied Biosystems) en mode de suivi de réactions multiples. Le traitement des données et la quantification des hormones ont été réalisés sur le logiciel Analyst 1.5 software (Applied Biosystems).

### **II.2.5. Détermination du contenu foliaire en ascorbate et glutathion**

Deux méthodes de détermination de l'acide ascorbique (AsA) et du glutathion (GSH) ont été utilisées. La première est une méthode spectrophotochimique basée sur le protocole de Queval & Noctor, (2007) dont le principe repose sur l'utilisation d'enzymes pour déterminer les formes oxydées et réduites. La deuxième méthode est une technique d'HPLC issue de Davey et al (2003). Cette dernière méthode a d'ailleurs été développée pendant la thèse pour déterminer les teneurs en AsA et GSH chez le chêne (Pellegrini et al., 2019). En effet, le dosage par la 1<sup>ère</sup> méthode appliquée sur des échantillons de chêne s'est révélé infructueux, probablement dû à des interactions biochimiques entre les antioxydants et les polyphénols lors de la phase de neutralisation des échantillons nécessaire à la réaction enzymatique.

#### **II.2.5.1. Méthode spectrophotochimique**

La méthode est basée sur l'absorbance de l'acide ascorbique (AsA) à 265 nm et son oxydation par l'ascorbate peroxydase. La forme réduite est déterminée sans prétraitement des extraits et l'AsA total est déterminé après réduction par du dithiothreitol (DTT) des formes oxydées, dehydroascorbate (DHA) et monodehydroascorbate (MDHA). Trois répliqués techniques ainsi qu'une gamme de standards sont réalisés pour chaque microplaque. La détermination du



glutathion (GSH) et du glutathion disulphide (GSSG), quant à elle, est réalisée sur les mêmes extraits en accord avec Griffith (1980), via la réaction spontanée du GSH avec l'acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), ce qui produit l'acide 2-Nitro-5-thiobenzoïque (TNB). L'absorbance du TNB est mesurée à 412 nm. Le pool total est déterminé après réduction du GSSG en GSH par la glutathion réductase. Dans un extrait, la forme oxydée GSSG est dosée après un prétraitement des extraits par du 2-vinylpyrimidine qui réagit avec le GSH et l'empêche de réagir avec le DTNB. Une gamme standard pour le GSH est réalisée pour chaque microplaque.

#### **II.2.5.2. Méthode HPLC**

La concentration en acide ascorbique (AsA) et glutathion (GSH) est déterminée dans le même extrait selon la méthode de Davey et al. (2003) avec des modifications. Les tissus foliaires sont broyés à l'azote liquide en fine poudre. 100 mg sont utilisés pour l'extraction dans un tube Eppendorf de 2 mL avec 1 % (w/w) de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et 1 mL de tampon d'extraction (6% (w/v) acide métaphosphorique (65% HPO<sub>3</sub>)) contenant 2 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). L'homogénéisation est ensuite réalisée au broyeur à bille. Puis, les extraits sont centrifugés à 18 000 g et 4 °C pendant 15 min. Le surnageant est filtré sur un filtre seringue de cellulose (0.45 µm).

L'extrait est divisé pour déterminer les formes réduites et le pool total de chaque composant : pour la forme réduite, 200 µL d'extrait sont mélangés à 100 µL de Tris base 2 M et 100 µL de tampon d'extraction, et pour le pool total, 200 µL d'extrait sont mélangés à 100 µL de dithiothréitol 200 mM (DTT) dans 2 M Tris base pour atteindre un pH compris entre 6 et 6.8. La réaction de réduction a lieu à température ambiante pendant 15 min avant d'être stoppée par l'ajout de 100 µL de tampon d'extraction (acidification). Les extraits sont conservés à 4 °C dans le noir avant la mesure.

Toutes les analyses sont réalisées sur l'HPLC Prominence de Shimadzu. L'analyse des échantillons et des standards est réalisée par injection de 40 µL sur une colonne en phase inverse, Kinetex EVO C18, 100 x 4.6 mm, encapsulée avec des particules sphériques de 2.6 µm, Phenomenex. La température de la colonne est thermostatée à 25 °C et les échantillons sont élués à un débit de 1.3 mL.min<sup>-1</sup>. La phase mobile est constituée de 3 solvants : A (0.04% (v/v) acide phosphorique, 0.1mM EDTA and 0.25% (v/v) méthanol in Milli-Q water), B (même composition que le tampon A avec 30 % acétonitrile) et C (100 % acétonitrile). Les composés sont séparés par la mise en place d'un gradient linéaire de tampon B de 0 à 100 % pendant 6 min. Puis la colonne est rincée et les tampons B et C maintenus respectivement à 5 % et 95 %

durant 19 min. Finalement, pour régénérer la colonne, le solvant est à 0 % B et C pendant 32 min. L'AsA et le GSH sont alors mesurés respectivement à 243 nm et 197 nm. Une courbe standard est déterminée à partir de solutions standards de L-AsA ou GSH préparées dans 3 % (w/v) d'acide métaphosphorique/1 mM EDTA, stabilisées avec du DTT 2.5 mM. Les concentrations des formes oxydées sont calculées par une méthode soustractive entre le pool total et le pool réduit.

## II.2.6. Activité enzymatique

### II.2.6.1. *Procédure extraction, filtration et dosage de protéines*

Environ 50 mg de poudre de feuilles sont homogénéisés dans 1,3 mL d'une solution contenant 100 mM de tampon Bicine-KOH (pH 7,8), 0.10 % (v/v) de Triton, 6 % (m/m) de PVP25, 10 % (v/v) de glycérol, 5 mM d'EGTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 % de PVPP (m/m) et 0,28 % (v/v) de cocktail protéase inhibiteur. Après centrifugation (20 000 x g pendant 20 min à 4°C), le surnageant est récupéré. Ensuite, 1 mL de surnageant est déposé sur une colonne (PD MiniTrap G25), puis élué avec 1,5 mL d'une solution contenant 100 mM de tampon Bicine-KOH (pH 7,8), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, et 10% (v/v) de glycérol. La solution obtenue est collectée et une partie est immédiatement utilisée pour le dosage des activités DHAR ET MDHAR et pour le dosage des protéines solubles. Le dosage de l'activité GR est également réalisé sur la solution éluée stockée à - 80 °C après addition d'une solution de DTT à 2 mM. Toutes les opérations sont réalisées entre 0 et 4 °C. Les protéines solubles sont quantifiées selon la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976), utilisant le bleu de Coomassie comme réactif. L'absorbance est mesurée à 595 nm. La concentration des protéines est déterminée par rapport à l'albumine de sérum bovin, utilisée comme standard (0 à 14 µg.mL<sup>-1</sup> dilués dans le tampon d'éluion).

### II.2.6.2. *Dosage de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR, EC 1.6.5.4)*

L'activité MDHAR est mesurée avec un protocole légèrement modifié par rapport à celui décrit initialement par Hossain et Asada, (1984). La réaction est réalisée en microplaques dans un volume final de 200 µL contenant 50 mM de tampon HEPES-KOH (pH 7,6), 2,5 mM de L-ascorbate (AsA), 0,2 mM de NADPH et 50 µL d'extrait filtré. Après 10 min d'incubation à 25 °C, elle est initiée par l'addition de 0,028 Unité d'Ascorbate oxydase (EC 1.10.3.3), puis suivie pendant 5 min par diminution de l'absorbance du NADPH à 340 nm. Une correction est faite par l'oxydation du NADPH en l'absence d'ascorbate oxydase. Trois répétitions techniques par réplicat biologique sont réalisées. L'activité MDHAR est finalement exprimée en nmol de NADPH oxydé par minute et par mg de protéines.

### **II.2.6.3. Dosage de la déhydroascorbate réductase (DHAR, EC 1.8.5.1)**

L'activité DHAR est également mesurée avec un protocole légèrement modifié comparé à celui décrit initialement par Hossain et Asada (1984). La réaction est une fois encore réalisée en microplaques dans un volume final de 200  $\mu$ L contenant cette fois 100 mM de tampon HEPES-KOH (pH 7), 2,5 mM de glutathion (GSH), 1 mM d'EDTA, 0,2 mM de DHA et 5  $\mu$ L d'extrait filtré. Elle est initiée par l'addition de DHA et réalisée à 25 °C, puis suivie pendant 5 min par augmentation de l'absorbance de l'ascorbate à 265 nm. La réaction non enzymatique du DHA par GSH est déduite et le niveau de réaction est corrigé en multipliant par un facteur de 0,98 (correction liée à l'absorbance de GSSG à 265 nm) (Asada, 1984). Quatre répétitions techniques par réplicat biologique sont réalisées au total. L'activité DHAR est finalement exprimée en nmol d'ascorbate produit par minute et par mg de protéines.

### **II.2.6.4. Dosage de la glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2)**

L'activité GR est mesurée selon la méthode décrite par Foyer et Halliwell (1976). La réaction est réalisée en microplaques dans un volume final de 200  $\mu$ L contenant 100 mM de tampon Tris-HCL (pH 7,8), 1 mM de disulfure de glutathione (GSSG), 1 mM d'EDTA, 0,2 mM de NADPH et 20  $\mu$ L d'extrait filtré (contenant 2 mM de DTT). Elle est initiée par l'addition de NADPH et réalisée à 30°C. La réaction est suivie pendant 15 min par diminution de l'absorbance du NADPH à 340 nm. Une correction est faite par l'oxydation du NADPH en l'absence de GSSG. Trois répétitions techniques par réplicat biologique sont réalisées. L'activité GR est exprimée en nmol de NADPH oxydé par minute et par mg de protéines.

## **II.2.7. Détermination de la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

### **II.2.7.1. Cytolocalisation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au 3,3'-diaminobenzidine**

Le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma D8001) est oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour former un précipité marron-brun. Le protocole est adapté de celui de Daudi et O'Brien, (2012), qui permet la mise en évidence visuelle de la localisation cellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour chacun des géotypes et chaque traitement, une feuille a été prélevée sur deux arbres provenant de chambres différentes. Trois disques ont été découpés dans chaque feuille avec un emporte-pièce de 6 mm de diamètre. Les disques foliaires ont ensuite été disposés dans deux microplaques de 12 puits chacune. Dans chaque puits, 1,5 ml d'une solution composée de 1 % DAB (w/v), MES 10 mM (pH 5,8) et Tween 20 (0,05% v/v) ont été ajoutés. Dans les quatre puits témoins, de l'ascorbate 10 mM a été ajouté à la solution précédente pour contrôler l'effet du DAB en éliminant le peroxyde d'hydrogène par réduction de celui-ci. Quatre autres puits de la solution tampon sans DAB ont également été préparés. Les disques ont ensuite été infiltrés

4 x 15 min, puis placés une nuit à l'obscurité. L'étape suivante est une étape de décoloration dans une solution éthanol:acétate:glycérol (3:1:1) bouillie à 100 °C pendant environ 20 min. Le tout est conservé à une température de 4 °C. Vingt-quatre heures plus tard, les disques ont été observés dans une solution de glycérol 50 % à l'aide d'un stéréomicroscope Nikon SMZ 1000 (grossissement 0,8x).

### **II.2.7.2. Détermination biochimique**

#### *II.2.7.2.a. Comparaison des méthodes de dosage*

La cytolocalisation par le DAB est décrite dans la littérature pour son manque de spécificité et un mécanisme de réaction en chaîne due à une activité peroxydase importante (Noctor et al., 2016). Plus intéressant seraient la détermination et la quantification des ROS produits lors d'un stress oxydant puisqu'ils constituent un élément important de la réponse des plantes confrontées à l'O<sub>3</sub> ou la sécheresse. Néanmoins, la plupart des méthodes de détermination des ROS ont été mises au point sur des cellules animales présentant un risque plus faible d'interaction entre les réactifs et des antioxydants type ascorbate ou polyphénols, présents en plus faible quantité que dans les plantes. En effet, l'ascorbate influence des méthodes utilisées chez les végétaux (Junglee et al., 2014; Veljovic-Jovanovic et al., 2002). Différentes techniques de dosage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existent cependant dans la littérature. Une liste non exhaustive des techniques les plus utilisées est présentée Tableau 3. Il en résulte une importante variation des concentrations déterminées dans la littérature, allant de 10 à 2000 nmol.g<sup>-1</sup> MF (Queval et al., 2008). Les recommandations les plus importantes pour améliorer la précision du dosage reposent sur la qualité de l'extraction en milieu acide pour limiter l'activation d'enzymes et l'utilisation d'ascorbate oxydase pour limiter les surestimations en cas de recyclage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les sous-estimations en cas d'interaction avec le sous-produit coloré permettant la quantification.

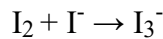
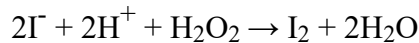
Tableau 3 : Différentes méthodes de détermination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parmi les plus couramment utilisés sur les extraits végétaux.

Méthode	Principe	Avantage	Inconvenient	Référence
<b>Sonde fluorescente</b>				
DCFH <sub>2</sub> -DA	L'oxydation par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> du dichlorodihydrofluoresceine diacetate (DFCH) produit du dichlorofluoresceine (DCF) fluorescent	Perméabilité cellulaire Facilité d'usage Répond au changement de contenus en Fe ou à l'activité peroxydase	Amplification de la fluorescence artéfactuelle Augmentation de l'intensité via un recyclage redox Implique un intermédiaire, DCF•-	Kalyanaraman et al., 2012
Amplex red	L'amplex red est oxydé par la peroxydase du raifort(HRP) en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> est produit de la resofurine (fluorescente)	L'oxydation dépendante HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de Amplex red en resorufine est très efficace. Pas de réaction avec O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Photooxydation en présence de GSH Interaction avec ascorbate Intermédiaire peu réagir avec O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
<b>Luminescence</b>				
Luminol	Détermination de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par mesure de la luminescence produite par l'oxydation du luminol (3-amino-phthal-hydrazide) par ferricyanide en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Bonne sensibilité pour l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Interaction avec ascorbate	Warm et Laties, 1981 Veljovic-Jovanovic et al., 2002 Queval et al., 2006
<b>Dépendant d'enzyme</b>				
Peroxydase	La méthode DMAB–MBTH–POX est basé sur le l'utilisation d'une peroxydase chromogénique et le couplage oxydatif du 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH) et de l'acide 3-(diméthylamino) benzoïque(DMAB)	Spécificité de la peroxydase pour H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Interaction avec ascorbate	Noctor et al., 2016 Veljovic-Jovanovic et al., 2002 Queval et al., 2006
<b>Colorimétrique</b>				
KI	Oxydation de l'iode de potassium (KI) par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produit du triiodure I <sub>3</sub> <sup>-</sup> (390nm)	Simplicité	Réagit avec AsA Sensible à la lumière et à l'O <sub>2</sub>	Junglee et al., 2014

En raison de contraintes techniques et temporelles, nous avons sélectionné la détermination colorimétrique à l'iodure de potassium. Ce choix repose sur 2 raisons principales : la simplicité de réalisation tout d'abord, mais également le fait qu'il ne soit pas nécessaire de neutraliser les échantillons pour éliminer l'ascorbate avec l'AO. Ce dernier point en particulier est rendu possible par les tests de Junglee et al. (2014) et le développement d'un protocole en une étape d'extraction et réaction simultanée.

#### *II.2.7.2.b. Détermination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par extraction/réaction simultanée à l'iodure de potassium*

La détermination du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est basée sur une version modifiée du protocole de Junglee et al.(2014). Le principe du dosage dépend de l'oxydation de l'iode de potassium (KI) par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon l'équation :



La quantification d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est possible en suivant l'absorbance du triiodide I<sub>3</sub><sup>-</sup> à 390nm.

100 mg de poudre sont homogénéisés dans 1 mL de tampon d'extraction (1/1/2, tampon phosphate à 10 mM (pH = 5.6), acide trichloracétique (TCA) (0.1%(w/v), v/v/v), KI à 1M) au broyeur à bille. La même étape est faite en parallèle avec du tampon contrôle (1/1/2, tampon phosphate à 10 mM (pH = 5.6), acide trichloracétique (TCA) (0.1%(w/v), v/v/v), H<sub>2</sub>O) pour soustraire l'absorption de l'échantillon. On centrifuge à 12,000 x g pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL puis de nouveau centrifugés à 12,000 x g pendant 5 min à 4°C. 200 µL de surnageant est ensuite déposé dans les puits d'une plaque UV. La plaque est agitée puis on réalise une lecture de DO à 390 nm. On réalise une gamme allant de 0 à 0.28 nmol/µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur chaque plaque.

## **II.2.8. Analyse de l'expression des gènes**

### ***II.2.8.1. Isolation des ARN et synthèse d'ADNc***

100 mg de poudre de feuille sont utilisés pour l'extraction d'ARN à l'aide du kit commercial, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Un traitement DNase est appliqué avec le kit DNA-free (Ambion). Les ARN totaux extraits (1 µg) sont utilisés avec le kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad) pour préparer les échantillons d'ADNc. Les ADNc sont dilués au 1/10 avec de l'eau stérile.

### ***II.2.8.2. Réaction en chaîne par polymérase - Real-Time RT-PCR***

Les niveaux de transcrits sont déterminés de manière quantitative par PCR en temps réel et l'utilisation de SYBR Green master mix (Bio-Rad), en accord avec les recommandations du

protocole du fabricant. La RT-PCR est réalisée par MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System ICycler (Biorad) avec des plaques de 96 puits, à une température de dénaturation de 58 °C et des contrôles négatifs. Trois réplicats techniques sont réalisés par plaque. Pour chaque programme PCR une courbe de fusion est tracée pour pouvoir vérifier que la fluorescence provient d'un seul amplicon. Les Crossing threshold values (Ct) sont obtenus avec le logiciel IQ™5 Optical System v2.0 (Bio-rad).

### II.2.8.3. Sélection des amorces

Pour nos analyses, toutes les cibles ont été identifiées dans la littérature sur *Arabidopsis thaliana* ou le peuplier, *Populus trichocarpa*. Pour les cibles d'*A. thaliana*, l'outil de bio-informatique phytozome v12.1 permet d'identifier les homologues chez le peuplier sur la base de blast de séquences protéiques et génomiques. Les gènes les plus proches des cibles chez le peuplier ont été étudiés et des amorces ont été dessinées en se basant sur la version 3 du génome de *Populus trichocarpa* et sur les transcrits prédits par phytozome. Le dessin des amorces obéit aux règles suivantes décrites dans la thèse de J. Dumont (2013):

- La taille des amorces est égale à 20 ou 21 bases (b)
- Pourcentage de (G+C) compris entre 38 % et 42 %
- Les amorces doivent avoir le même Tm égal à 58 °C ou 60 °C
- Taille de l'amplicon (zone transcrite entre les amorces, additionnée à la taille de chacune des amorces) comprise entre 100 et 150 pb
- La séquence de l'amorce doit être au moins différente de 3 b par rapport à toute autre séquence dans le génome
- Les amorces ne doivent pas avoir plus de 4 nucléotides identiques consécutifs
- Dans les 5 derniers nucléotides de l'extrémité 3' il ne doit pas y avoir plus de 2 C ou G
- Les couples d'amorces ont été vérifiés pour éviter la formation de dimère ou d'autohybridation, grâce aux logiciels en ligne primer3 (Untergasser et al., 2012)

La spécificité des couples d'amorces a été testée par PCR sur un mix de l'ADNc de chacun des deux génotypes étudiés, dans l'ensemble des conditions suivi d'un dépôt et migration sur gel.

### II.2.8.4. Real-Time RT-PCR data analysis

Les valeurs de Ct (Crossing threshold) et l'efficacité de la PCR sont utilisées pour calculer le niveau d'expression par la méthode comparative delta-delta-CT, améliorée pour la prise en compte de plusieurs gènes de référence (Hellemans et al., 2007). Tous les résultats de RT-qPCR sont issus de la moyenne de 4 répétitions biologiques indépendantes. Pour chaque réplicats biologiques, les niveaux relatifs du transcrit correspondent à la moyenne de trois réplicats

techniques. Les meilleurs gènes de référence sont déterminés par la méthode du logiciel GeNorm (Vandesompele et al., 2002).

### II.2.9. Indicateur de seuil de risque à l’ozone

Les concentrations d’O<sub>3</sub> dans les chambres de culture sont enregistrées par un central d’acquisition de données Campbell à raison de 2 mesures par chambre et par heure. Ces 2 mesures permettent de calculer une concentration horaire moyenne, [O<sub>3</sub>]<sub>h<sub>i</sub></sub>, en ppb. L’indice SUM00 correspond à la somme des moyennes horaires de concentration en O<sub>3</sub> et est exprimé en ppb.

$$\text{SUM00} = \sum_i^n [\text{O}_3]_{h_i}$$

L’indice utilisé par l’Union européenne via la directive européenne (2008/50/CE) du 21 mai 2008 est l’AOT 40 (accumulated dose over a threshold of 40 ppb), défini comme la somme des différences entre les moyennes horaires et un seuil de 40 ppb et en annulant les moyennes horaires pour un éclaircissement énergétique minimum de 50 W.m<sup>-2</sup> (Kärenlampi & Skärby, 1996). Dans nos conditions de culture sans fumigation lors de la période de nuit, calculer l’AOT 40 revient à calculer un SUM 40.

$$\text{AOT40} = \sum_i^n ([\text{O}_3]_{h_i} - 40)$$

Plus récemment, la communauté scientifique s’est orienté vers un indice prenant en compte le flux d’O<sub>3</sub> entrant dans les feuilles : le POD<sub>y</sub> (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of y nmol O<sub>3</sub> m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Cet indice a pris plusieurs noms dans la littérature : le POD<sub>0</sub>, qui correspond au CUO (cumulative ozone uptake), et le AFst<sub>Y</sub> (Accumulated stomatal flux above a threshold of Y nmol m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Dans notre cas, le seuil de toxicité est fixé à 0 nmol O<sub>3</sub> m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. L’entrée de l’O<sub>3</sub> dans les feuilles dépend de la conductance stomatique à la vapeur d’eau (g<sub>s</sub>). Pour déterminer le flux d’O<sub>3</sub> entrant, on détermine donc la conductance stomatique à l’ozone (g<sub>O<sub>3</sub></sub>) à partir du coefficient de diffusion dans l’air de l’H<sub>2</sub>O et celui de l’O<sub>3</sub>. Le coefficient de diffusion de la vapeur d’eau est D<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 0.25 cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et celui de l’ozone D<sub>O<sub>3</sub></sub> = 0.167 cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (Laisk et al., 1989). On a donc :

$$\frac{D_{\text{O}_3}}{D_{\text{H}_2\text{O}}} = 0.668$$



Le flux d'O<sub>3</sub> entrant dans les feuilles ( $F_{O_3}$ ) peut être estimé par cette relation (Bagard et al., 2008) :

$$F_{O_3} = 0.668 g_s [O_3]h$$

La conductance stomatique ( $g_s$ ) a été mesurée tous les deux à trois jours avec un Li-Cor 6200, selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2.3.1. Comme les conditions environnementales régnant dans la chambre de fumigation sont stables au cours de la journée, la valeur de  $g_s$  mesurée un jour donné, est assignée à toutes les heures de ce jour. Pour les jours sans mesure, les valeurs horaires moyennes de  $g_s$  sont obtenues par interpolation linéaire entre les valeurs des jours précédant et suivant. Le  $POD_0$  s'exprime donc comme la somme cumulée du flux d'O<sub>3</sub> entrant dans la feuille :

$$POD_0 = \sum_i^n F_{O_{3i}}$$

### II.3. Analyses statistiques

La totalité des analyses statistiques a été réalisée sur le logiciel de statistique libre R 3.1.0 (R Development Core Team). Les analyses de variance impliquant l'effet du déficit hydrique, de l'O<sub>3</sub> et du génotype ont été réalisées à l'aide du package *nlme* (Pinheiro et al., 2018). L'hétéroscédasticité et l'homogénéité des variances sont assumées à partir des graphiques des résidus issus du modèle linéaire. Pour les mesures répétées (e.g. cinétique des échanges gazeux au Li-Cor 6200), les données ont été étudiées via l'utilisation d'un modèle linéaire à effet mixte avec la répétition biologique en variable aléatoire et les facteurs suivants : déficit hydrique, O<sub>3</sub> et génotype en tant que variable fixe. Les tests de comparaisons multiples ont été réalisés avec le package *emmeans* (Lenth, 2016). La majorité des figures sont réalisées à l'aide de *ggplot2* (Wickham, 2009).

# **Chapitre III. Evaluation de la sensibilité des deux génotypes de peupliers en réponse à l'ozone**

---

### III.2. Introduction : les deux génotypes dans la littérature

Les deux génotypes de peupliers euraméricains, *Populus x canadensis* (*Populus nigra x deltoides*), ont été sélectionnés dans des pays différents. Le génotype Robusta est une sélection française ancienne (1895), dont l'usage en sylviculture est pratiquement abandonné (Marron, 2003). Le génotype Carpaccio est issu d'une sélection italienne relativement récente (reçu à l'Association FOForêt-CELLulose (AFOCEL) en 1976). Il n'existe cependant aucune information disponible concernant d'éventuelles surfaces plantées de ce génotype. Des différences de résistance aux pathogènes ont été observées entre les deux génotypes, Robusta y étant plus sensible que Carpaccio ([www.agriculture.gouv.fr](http://www.agriculture.gouv.fr)). Dans la littérature scientifique, les deux génotypes ont été étudiés séparément en réponse à la sécheresse et à l'O<sub>3</sub>. Robusta est d'ailleurs qualifié de génotype « efficient » pour la fermeture des stomates en réponse au déficit hydrique (Ridolfi & Dreyer, 1997). Le génotype Carpaccio, quant à lui, a été récemment étudié en réponse à la sécheresse (Cohen et al., 2010; Durand et al., 2019b) et est plutôt considéré comme étant « tolérant » au déficit hydrique. Vis-à-vis de l'O<sub>3</sub>, Robusta a été qualifié de « tolérant » comparé à un clone de *Populus nigra* (Van Hove et al., 2001, 1999). Ce génotype a également été classé « tolérant » comparé à 9 autres génotypes de peupliers, car il maintient une photosynthèse relativement importante avec une fermeture moyenne des stomates sous O<sub>3</sub> (Gandin et al., 2019). Par contre, lors d'études réalisées au sein du laboratoire pendant les thèses de A. Dghim (2012) et J. Dumont (2013), Robusta fut retenu comme sensible compte tenu de la chute des feuilles et de l'apparition de nécroses sur les plus âgées d'entre elles lors d'une exposition à 120 ppb O<sub>3</sub>, et ce de manière plus précoce que le génotype Carpaccio exposé aux mêmes concentrations (Dghim, 2012). La rapidité de fermeture des stomates était également un critère pris en compte pour classer ce dernier génotype comme plus résistant que Robusta. En effet, Carpaccio tend à fermer plutôt et de manière plus importante ses stomates. Par la suite, une étude approfondie de la dynamique de réponse des stomates pointa une vitesse de réponse plus lente pour Robusta comparé à Carpaccio (Dumont et al., 2013). Cette réponse est également associée chez Carpaccio à une plus forte corrélation entre l'augmentation de l'activité de la PEPC et l'activité de deux NADP-déshydrogénases. Il a été avancé qu'une plus forte activité des déshydrogénases NADP-dépendantes pourrait être mise en relation avec le maintien d'un niveau plus élevé en NADPH chez Carpaccio (Dghim et al., 2013). Il en résulterait un meilleur apport de pouvoir réducteur pour la détoxification notamment pour alimenter le cycle ascorbate-glutathion. Une augmentation importante de la biosynthèse du glutathion a été également montrée chez le génotype Carpaccio (Dumont et al., 2014b).

Les deux génotypes sont également caractérisés par des différences de croissance importantes, Robusta ayant une croissance plus lente que Carpaccio (Dghim, 2012; Dumont, 2013). En raison de résultats contradictoires à ces travaux lors des premières expérimentations réalisées au cours de cette thèse et obtenus sur les deux génotypes exposés à 120 ppb d'O<sub>3</sub>, il nous est apparu légitime de poser les questions suivantes :

- La comparaison des génotypes à une seule concentration en O<sub>3</sub> est-elle suffisante pour conclure à une différence de sensibilité des deux génotypes ?
- Quels sont les paramètres physiologiques les plus pertinents pour déterminer une différence de tolérance à l'O<sub>3</sub> ?
- Est-ce qu'une étude prenant en compte différentes doses d'O<sub>3</sub> et l'utilisation des relations au POD<sub>0</sub> peut apporter des éléments de réponse ?

En avril 2018, dans le cadre de cette thèse, une expérimentation visant à comparer la réponse des deux génotypes de peupliers soumis à différentes concentrations d'O<sub>3</sub> (Figure 23) a été mise en place. Elle comportait 48 arbres (24 de chaque génotype) répartis dans six phytotrons : deux chambres témoins en air filtré et quatre chambres avec des concentrations d'O<sub>3</sub> différentes : 80, 120, 150 et 200 ppb (décrit dans la section II.1.6 du M&M).

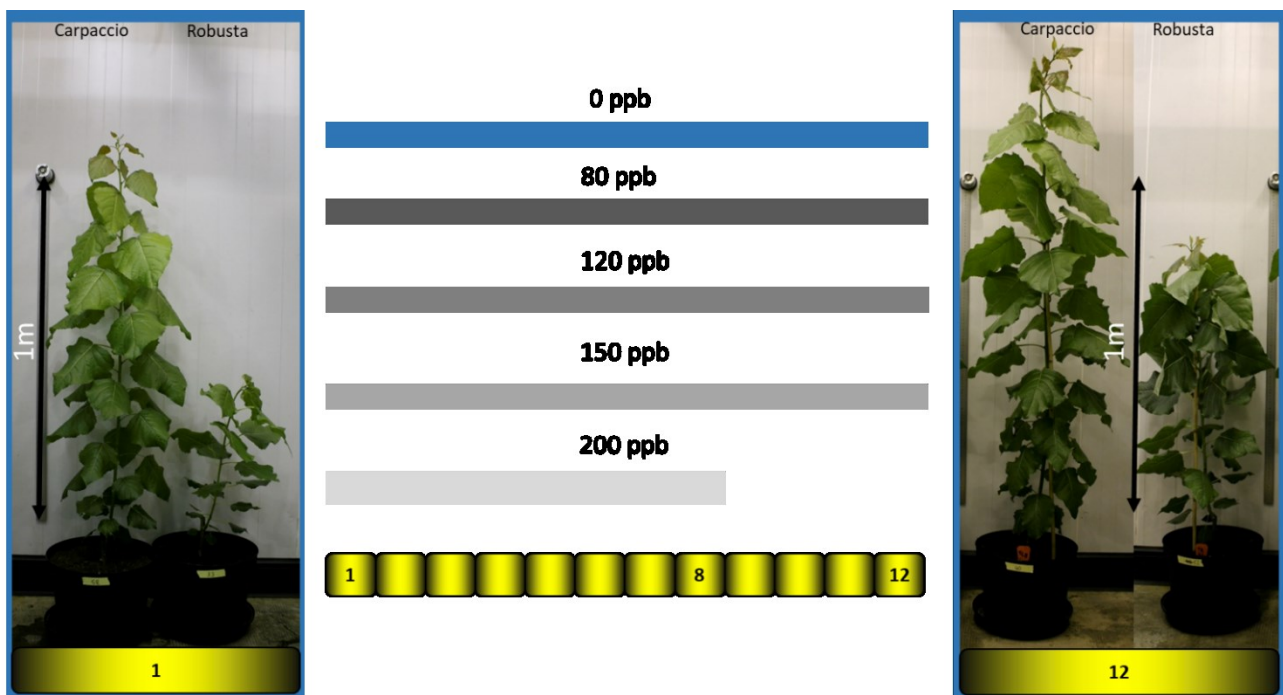


Figure 23 : Représentation schématique des différents traitements appliqués sur les deux génotypes lors de l'expérimentation 4. Les arbres soumis au traitement 200 ppb ont été prélevés après 8 jours de fumigation à cause de dégâts trop importants, tandis que pour les traitements 80, 120 et 150 ppb, les arbres ont été prélevés à 12 jours.

Pour répondre aux questions posées, différents paramètres ont été suivis :

- Des paramètres développementaux : hauteur, diamètre, nombre de feuilles et biomasse finale
- Une cinétique d'échanges gazeux (assimilation nette pour le CO<sub>2</sub> et la conductance stomatique) grâce à un appareil de mesure portable Li-6200 (Li-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA)
- L'évolution du contenu en pigments (chlorophylles totales, flavonols, anthocyanes) mesurée de manière non-destructive à l'aide d'un Dualex
- La détermination du contenu cellulaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une méthode colorimétrique au KI

La feuille suivie pour la cinétique d'échanges gazeux, l'évolution du contenu en pigments et la détermination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est la première feuille pleinement développée (à partir de l'apex). Dans cette expérimentation nous avons opté pour que cette feuille soit située au même niveau entre les individus des deux géotypes afin de comparer des feuilles exposées à une même quantité de lumière. Ainsi, pour Robusta, la feuille suivie est la 9<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> et pour Carpaccio, la 12<sup>e</sup> ou 13<sup>e</sup>, depuis le bourgeon apical. Pour compenser la différence de taille entre les deux géotypes, les plants du géotype Robusta ont été surélevé de 40 cm.

La cinétique obtenue pour la conductance stomatique et le suivi des concentrations d'O<sub>3</sub>, afin de calculer un POD<sub>0</sub> d'après la méthode de Bagard et al. (2015), l'objectif final étant d'analyser la covariance des différents paramètres suivis en fonction de la dose d'O<sub>3</sub> entrante dans la feuille.

L'apparition rapide de symptômes foliaires et de la chute des feuilles à 200 ppb pour les 2 géotypes nous a contraint à terminer l'expérimentation pour cette dose d'O<sub>3</sub> le huitième jour de traitement, alors que, pour les autres, la fin de l'expérimentation a été portée à douze jours.



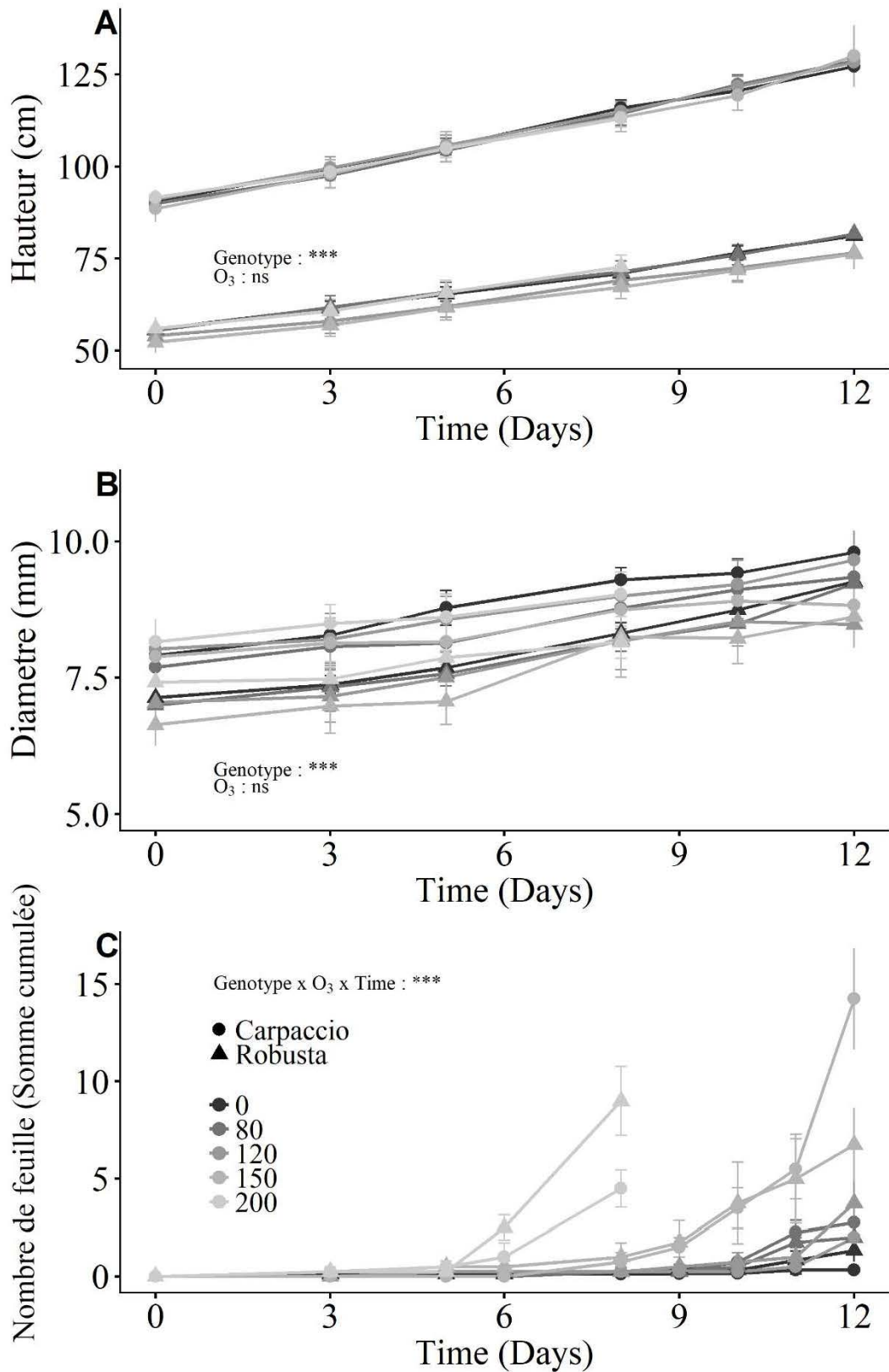


Figure 24 : Évolution des paramètres de croissance pour les deux génotypes soumis à 5 doses d'O<sub>3</sub> différentes. La hauteur (A), le diamètre (B) et la somme cumulée du nombre moyen de feuilles perdues (C) ont été déterminés pour Carpaccio (rond) et Robusta (triangle) soumis à 5 doses d'O<sub>3</sub> différentes : 0, 80, 120, 150 et 200 ppb (dégradé de gris foncé à gris clair). Moyenne : n=4±se.

### III.3. Résultats expérimentation 4

#### III.3.1. Différence de croissance des deux génotypes de peuplier

Indépendamment de la dose d'O<sub>3</sub>, les deux génotypes présentent une différence importante de croissance en hauteur : Carpaccio croît plus rapidement que Robusta, à raison de 38 cm en 12 jours contre 25 cm pour Robusta (Figure 24, A). La différence de croissance en diamètre de la tige est, elle, moins importante entre les deux génotypes et il existe une variabilité biologique importante. Le diamètre de Carpaccio est supérieur en moyenne de 1 mm à celui de Robusta au temps 0 (Figure 24, B). Pour les deux génotypes, la croissance de la tige, en diamètre et en hauteur, n'est pas affectée significativement par les différentes doses d'O<sub>3</sub>. Par contre, les différentes doses d'O<sub>3</sub> sont responsables d'un décalage temporel de la chute de feuilles (Figure 24, C). À 200 ppb, le nombre de feuilles tombées au cours de l'expérimentation est plus important chez Robusta que Carpaccio (moyenne de 9 vs 4), tandis qu'à 150 ppb, la chute de feuilles est plus importante chez Carpaccio (14 vs 7). À 120 et 80 ppb, la réponse est identique entre les traitements et entre les génotypes (Figure 24, C). Les différentes doses d'O<sub>3</sub> sont également responsables d'une diminution de la biomasse des feuilles et des tiges, à la fois pour Robusta et Carpaccio. À partir de la concentration 150 ppb, la biomasse diminue de plus de 20 % par rapport au contrôle (Tableau 4). À 150 ppb, Carpaccio est plus impacté que Robusta pour la perte de masse des feuilles (- 29 % vs - 21 %, respectivement). A l'inverse, la diminution de biomasse des tiges est supérieure pour Robusta que pour Carpaccio (- 18 % vs - 13 %, respectivement). A 200 ppb, la diminution de biomasse des feuilles et des tiges est de l'ordre de 30 % pour Carpaccio. Pour Robusta, elle est de - 20 % pour les feuilles et nulle pour les tiges.



Tableau 4 : Nombre de feuilles et masse sèche (MS) des tiges et feuilles des génotypes Carpaccio et Robusta soumis à une fumigation d'O<sub>3</sub> de 0, 80, 120, 150 pendant 12 jours et 8 jours pour le traitement 200 ppb. Moyenne : n=4±se.

<i>Date</i>	<i>GNT</i>	<i>TO</i>	<i>Nombre de feuilles</i>	<i>MS tige (g)</i>	<i>MS feuille (g)</i>
8	Carpaccio	0	38.5 ± 0.65	13.47 ± 1.04	22.57 ± 1.36
		200	36.5 ± 0.5	9.43 ± 0.78	15.15 ± 0.93
	Robusta	0	30.5 ± 0.96	5.47 ± 1.24	15.47 ± 2.89
		200	26.5 ± 0.5	5.55 ± 0.7	10.82 ± 1.74
Génotype			<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>0.026</b>
O <sub>3</sub>			<b>0.01</b>	0.09	<b>0.02</b>
Genotype x O <sub>3</sub>			0.295	0.078	0.553
12	Carpaccio	0	40.5 ± 0.85	13.73 ± 0.9	23.23 ± 1.35
		80	41.25 ± 1.97	12.65 ± 1.53	22.8 ± 2.12
		120	40.75 ± 1.31	12.72 ± 1.02	21.7 ± 1.49
		150	34.5 ± 2.9	11.98 ± 1.4	16.65 ± 2.67
	Robusta	0	32.83 ± 0.4	8.53 ± 0.77	21.48 ± 1.71
		80	29.25 ± 1.8	8.2 ± 0.74	20.9 ± 1.15
		120	27 ± 2.12	8.05 ± 1.14	19.73 ± 2.08
		150	28.5 ± 1.55	7.03 ± 1.11	16.98 ± 2.11
Génotype			<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	0.314
O <sub>3</sub>			<b>0.010</b>	0.502	<b>0.025</b>
Génotype x O <sub>3</sub>			0.295	0.986	0.916

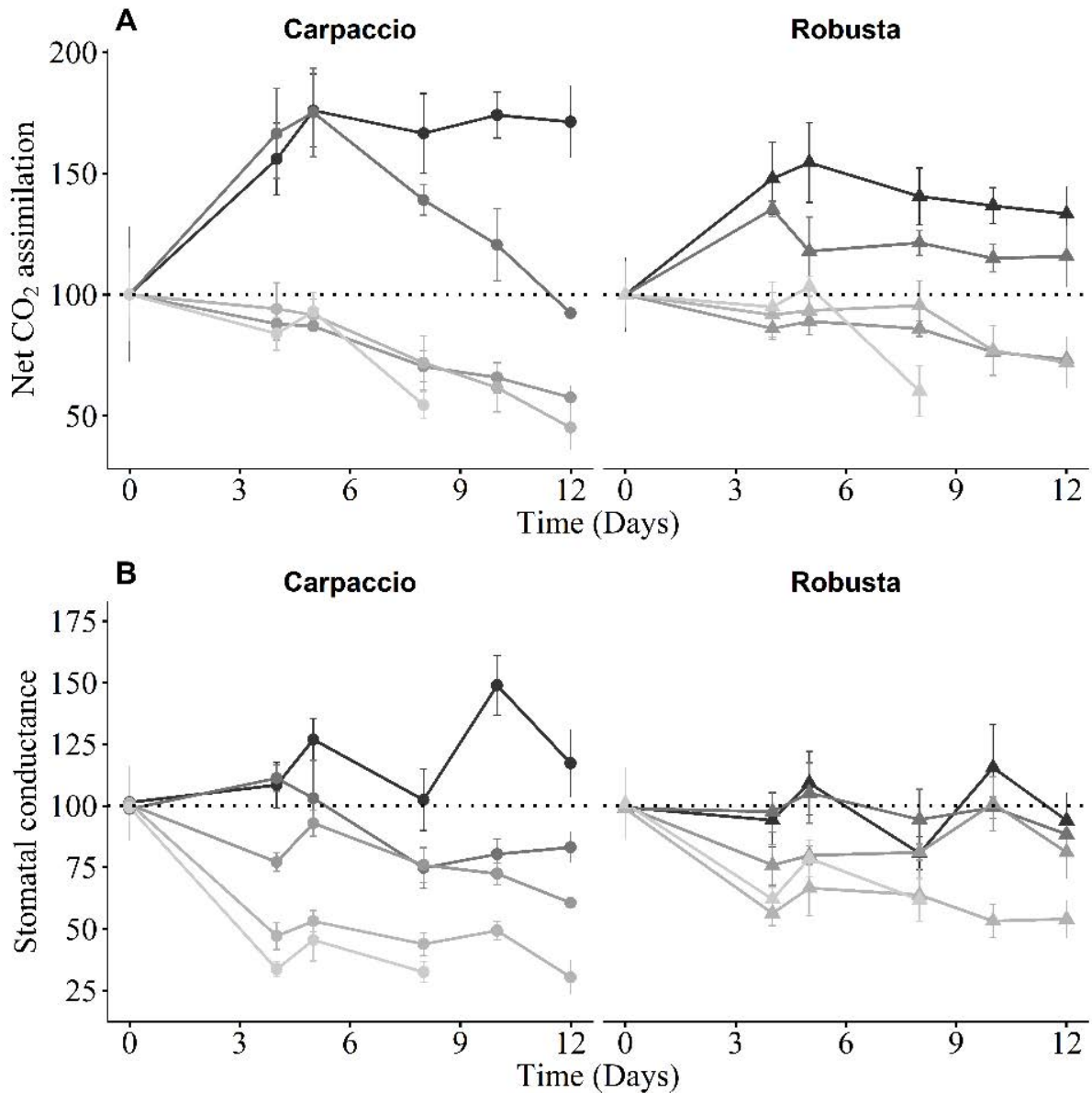


Figure 25 : Cinétique d'évolution des échanges gazeux foliaires pour Carpaccio et Robusta soumis à différentes doses d'O<sub>3</sub>. (A) Assimilation nette pour le CO<sub>2</sub> et (B) la conductance stomatique à la vapeur d'eau ont été déterminées pour les deux génotypes au cours des traitements. Les deux paramètres sont représentés en pourcentage relatif au premier jour (moyenne, n=4±se) pour les deux génotypes Carpaccio (rond) et Robusta (triangle), soumis à 5 doses d'O<sub>3</sub> différentes de 0, 80, 120, 150 et 200 ppb (dégradé de gris foncé à gris clair).

### III.3.2. Impacts sur les échanges gazeux et conséquences pour le POD<sub>0</sub>

Pour les deux génotypes, l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (A<sub>n</sub>) augmente en traitement contrôle jusqu'à se stabiliser après 5 jours, et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 25, A). Pour Carpaccio, A<sub>n</sub> augmente de 4 à 7 μmol CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Ces valeurs absolues sont inférieures à Robusta, pour lequel, A<sub>n</sub> augmente 6 à 9 μmol CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> en 5 jours, avant de diminuer légèrement et progressivement pour atteindre 8 μmol CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> après 12 jours en condition

contrôle (0 ppb d'O<sub>3</sub>). Chez Carpaccio, A<sub>n</sub> diminue à partir de 3 jours pour tous les traitements supérieurs à 80 ppb d'O<sub>3</sub>. A<sub>n</sub> est alors deux fois plus faible que dans les conditions air filtrés. Pour le traitement à 80 ppb, A<sub>n</sub> augmente jusqu'à 5 jours avant de décroître de manière continue jusqu'à la fin de l'expérimentation (- 60 % par rapport au contrôle). Pour Robusta, les effets de l'O<sub>3</sub> sur A<sub>n</sub> suivent le même schéma pour les traitements supérieurs à 80 ppb, mais avec une diminution moins importante par rapport au premier jour. Par contre, pour le traitement 80 ppb, A<sub>n</sub> diminue entre 5 et 6 jours, mais pour se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérimentation autour de valeurs inférieures de 20 % à celle du contrôle (Figure 25, A).

Pour les deux génotypes, les valeurs de conductance stomatique (g<sub>s</sub>) sont identiques au début du traitement, autour de 0.35 mol H<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Pour Carpaccio, g<sub>s</sub> tends à augmenter en traitement contrôle, jusqu'à atteindre 0.45 mol H<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> à la fin de l'expérimentation (moyenne entre 10 et 12 jours), alors que, pour Robusta, g<sub>s</sub> est relativement stable (Figure 25, B). Chez Carpaccio, g<sub>s</sub> diminue au cours du temps dans les chambres soumises à l'O<sub>3</sub> (Figure 25, B). Plus la concentration en O<sub>3</sub> est élevée, plus la conductance est faible (Figure 25, B). Après 12 jours d'expérimentation à 80, 120 et 150 ppb, la conductance stomatique est diminuée respectivement de 26 %, 56 % et 78 % par rapport aux témoins. Pour les concentrations les plus élevées (150 et 200 ppb), g<sub>s</sub> semble répondre dès le début de l'expérimentation. En ce qui concerne Robusta, g<sub>s</sub> est moins fortement impactée. En effet, elle ne l'est pas à 80 ppb. À 120 ppb, cependant, les stomates se ferment au début du traitement, puis se rouvrent à partir du 8<sup>e</sup> jour et à la fin de l'expérimentation. g<sub>s</sub> est alors identique au traitement contrôle (0.31 μmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Pour les concentrations les plus élevées, 150 et 200 ppb, g<sub>s</sub> diminue d'environ 30% par rapport au témoin dès 4 jours d'expérimentation et se maintient ainsi jusqu'à la fin.

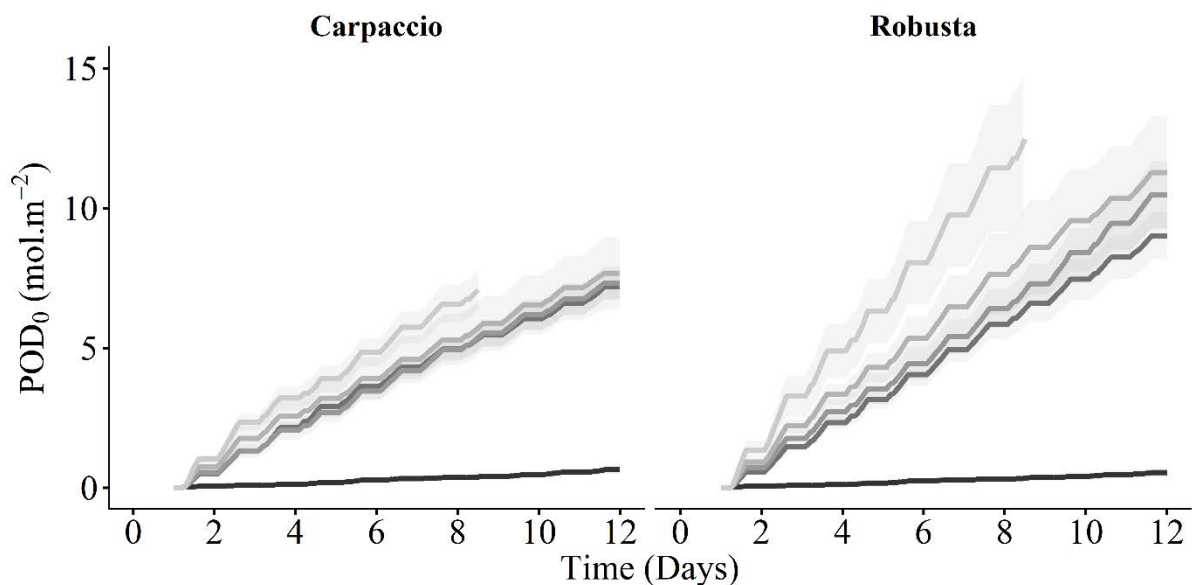


Figure 26 : Evolution du POD<sub>0</sub> en fonction du temps pour les deux génotypes, Carpaccio et Robusta, soumis à cinq traitements de fumigation d’O<sub>3</sub> (0, 80, 120, 150 et 200 ppb, dégradé de gris foncé à gris clair).

Comme décrit plus haut, la conductance stomatique de Carpaccio diminue de manière proportionnelle à la dose d’O<sub>3</sub> : plus la concentration d’O<sub>3</sub> est forte, plus les stomates sont fermés, ce qui a pour résultat l’observation d’un POD<sub>0</sub> identique pour les concentrations d’ozone 80, 120 et 150 ppb (Figure 26). Néanmoins, le POD<sub>0</sub> est plus élevé pour le traitement à 200 ppb (Figure 26). Dans le cas de Robusta, le POD<sub>0</sub> augmente en fonction des doses croissantes d’O<sub>3</sub>. Au cours de cette expérimentation, le POD<sub>0</sub> est plus élevé pour le génotype Robusta que pour Carpaccio, quelle que soit la concentration d’O<sub>3</sub> considérée (Figure 26).

### III.3.3. Pigments

En condition contrôle, Robusta présente des teneurs en chlorophylle plus élevées que Carpaccio (Indice des chlorophylles : 29 vs 19). Rapportée à la valeur mesurée au temps initial, la teneur en chlorophylle dans les feuilles augmente pour les deux génotypes, à raison de 75 % pour Carpaccio et 50 % pour Robusta (Figure 27, A). Sous traitement O<sub>3</sub>, l’augmentation de la teneur en chlorophylle dans les feuilles est plus faible pour les deux génotypes. En effet, pour Carpaccio, le pourcentage de chlorophylle au 3<sup>e</sup> jour de l’expérimentation augmente de 20 % en moyenne (toutes concentrations confondues) par rapport au premier jour (Figure 27, A). À partir du 5<sup>e</sup> jour, les teneurs diminuent pour les concentrations les plus élevées (150 et 200 ppb), tandis que pour les traitements 80 et 120 ppb, elles diminuent à partir du 10<sup>e</sup> jour seulement. En fin de traitement, les teneurs en chlorophylle à 80 ppb sont 15 % supérieures à celles mesurées à 120 ppb (Figure 27, A). Pour Robusta, les teneurs augmentent également de 20 % en moyenne

sous O<sub>3</sub> le 3<sup>e</sup> jour, avant de chuter à 200 ppb et de tendre à se stabiliser pour les 3 autres concentrations d'O<sub>3</sub> (80, 120 et 150 ppb).

Concernant les anthocyanes, les teneurs des deux génotypes tendent à diminuer en condition contrôle (- 50 % à la fin de l'expérimentation par rapport au 1<sup>er</sup> jour) (Figure 27, B). Pour Carpaccio soumis à 80 ppb et 120 ppb, les teneurs se stabilisent à 75 % et 100 %, respectivement, par rapport au jour 1. Pour le traitement 200 ppb, la tendance est à l'augmentation (+ 25 % les 3 derniers jours de l'expérimentation). Pour le génotype Robusta, les teneurs en anthocyanes sont plus variables entre les traitements O<sub>3</sub>, avec une augmentation très marquée aux plus fortes concentrations. À 80 et 120 ppb, les teneurs en anthocyanes tendent à se stabiliser autour des valeurs de début de mesure, tandis que pour les concentrations élevées (150 et 200 ppb), elles ont augmenté d'environ 30 %.

Pour les deux génotypes, les teneurs en flavonols sont plus élevées sur la face supérieure que sur la face inférieure (Indice des flavonols : 0.42 vs 0.18 pour Carpaccio, 0.35 vs 0.18 pour Robusta). En condition contrôle, les teneurs sont relativement stables pour les deux faces (peu de variation par rapport au t=0), à l'exception des teneurs de la face supérieure chez Carpaccio, qui diminuent en fin d'expérimentation (Figure 27, C & D). Pour ce même génotype, les traitements O<sub>3</sub> entraînent une augmentation des teneurs en flavonols, plus marquées sur les faces inférieures des feuilles (Figure 27, C & D). À 150 ppb, les teneurs en flavonols augmentent de 80 %. Pour Robusta, l'augmentation des flavonols est marquée à 200 et 150 ppb sur les deux faces. À 200 ppb, elle est de 40 % sur chacune des deux faces.

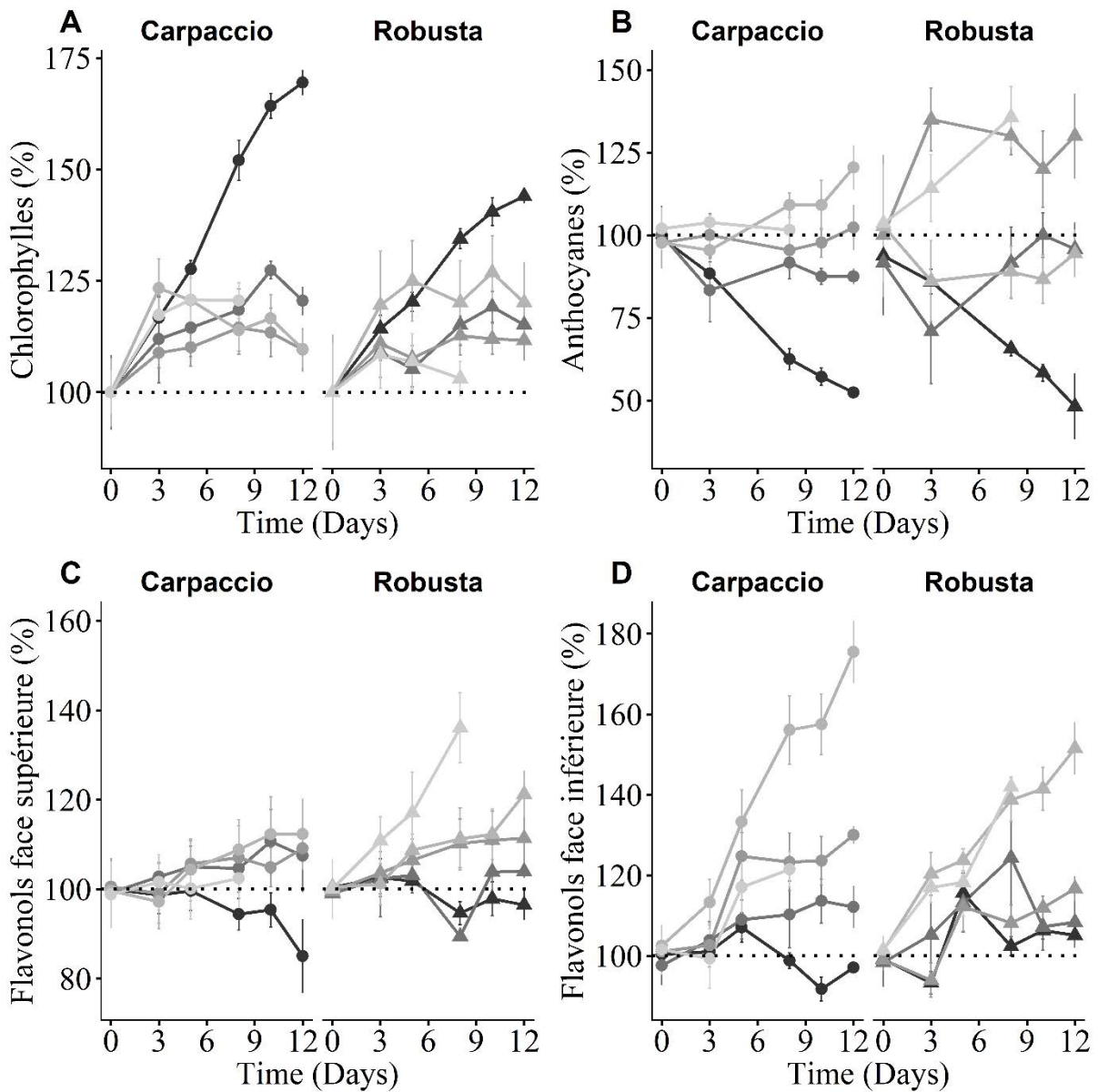


Figure 27 : Cinétique d'évolution des pigments foliaires pour Carpaccio et Robusta soumis à différentes doses d'O<sub>3</sub>. Les teneurs en chlorophylle (A), en anthocyanes (B) et en flavonols pour la face supérieure (C) et inférieure (D) ont été déterminées pour les deux génotypes, Carpaccio (rond) et Robusta (triangle), soumis à 5 doses d'O<sub>3</sub> différentes, de 0, 80, 120, 150 et 200 ppb (dégradé de gris foncé à gris clair). Les teneurs (moyenne, n=4±se) sont représentées en pourcentage relatif au premier jour.

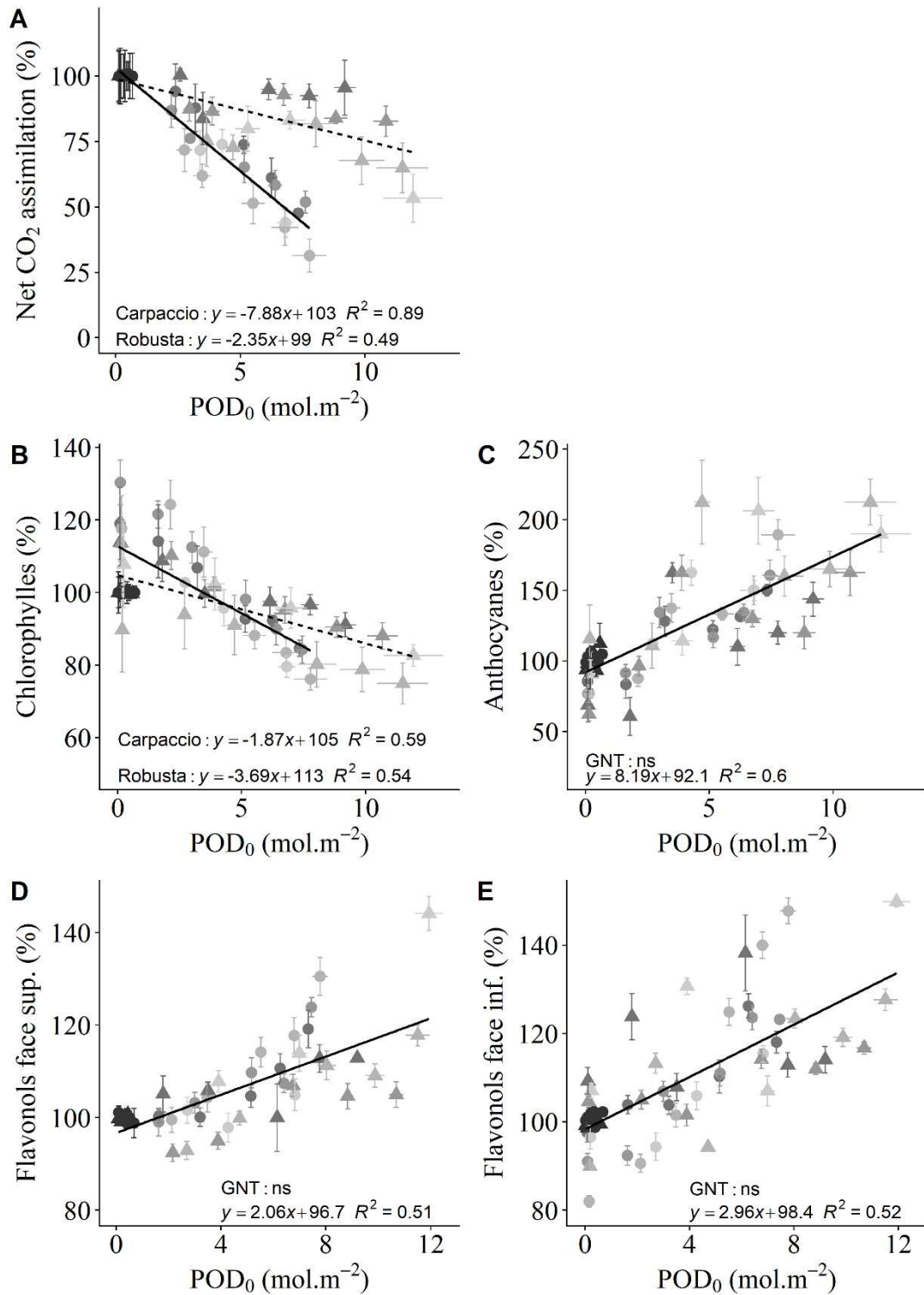


Figure 28 : Réponse des paramètres physiologiques foliaires au POD<sub>0</sub>. La moyenne (n=4), normalisée par rapport au contrôle (0 ppb), pour (A) l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et les teneurs en (B) chlorophylle, (C) en anthocyanes et en flavonols sur la face supérieure (D) et inférieure (E) a été exprimée en relation au POD<sub>0</sub> (Flux d'ozone entrant) pour les deux génotypes, Carpaccio (rond) et Robusta (triangle). Les traitements sont représentés par des nuances de gris foncé à gris clair, du contrôle vers 200 ppb. L'effet du POD<sub>0</sub> et du facteur génotype (GNT) a été testé par ANCOVA (p<0.05).

### III.3.4. Évolution en fonction du $POD_0$

Il y a une relation de corrélation entre la diminution de l'assimilation et l'augmentation du  $POD_0$  pour les deux génotypes (Figure 28, A). Pour Carpaccio, cette relation est nettement plus marquée ( $R^2=0.89$ ), avec une diminution de  $A_n$  supérieure à 50 % par rapport au contrôle, à partir de 5 mol.m<sup>-2</sup> de  $POD_0$ . La diminution des teneurs en chlorophylle est également liée à l'augmentation du  $POD_0$ , mais la force de la relation est moyenne pour les deux génotypes, le  $R^2$  étant de 0.59 et 0.54 pour Carpaccio et Robusta, respectivement (Figure 28, B). Il existe une légère différence de relation entre les deux génotypes, principalement due à une variabilité importante à faible  $POD_0$ . L'évolution des teneurs en anthocyanes ou en flavonols pour les deux faces est corrélée positivement au  $POD_0$ . L'analyse de covariance montre qu'il n'y a pas d'effet génotype ( $p>0.05$ ) (Figure 28, C, D et E).

### III.3.5. Détermination du peroxyde d'hydrogène et des symptômes visibles

Pour les deux génotypes, le contenu en  $H_2O_2$  dans les feuilles est similaire (environ 30 nmol. g<sup>-1</sup>MF). Le traitement  $O_3$  n'affecte donc pas significativement les teneurs en  $H_2O_2$  (Figure 26). Des symptômes visibles (chlorose et nécrose) sont observés sous chaque traitement  $O_3$  et sur chaque génotype. À 80 et 120 ppb, les nécroses apparaissent sous forme de petits points blancs à la surface des feuilles. À 150 et 200 ppb, les nécroses, de couleur brune, sont plus larges et s'étendent sur des surfaces de plusieurs centimètres de large pour les feuilles les plus atteintes. À 200 ppb, elles apparaissent dès le premier jour chez les deux génotypes, mais les feuilles du génotype Robusta semblent plus atteintes que celles de Carpaccio. À 150 ppb, ce sont les feuilles de Carpaccio qui semblent présenter plus de symptômes que Robusta, notamment des chloroses (Figure 29).



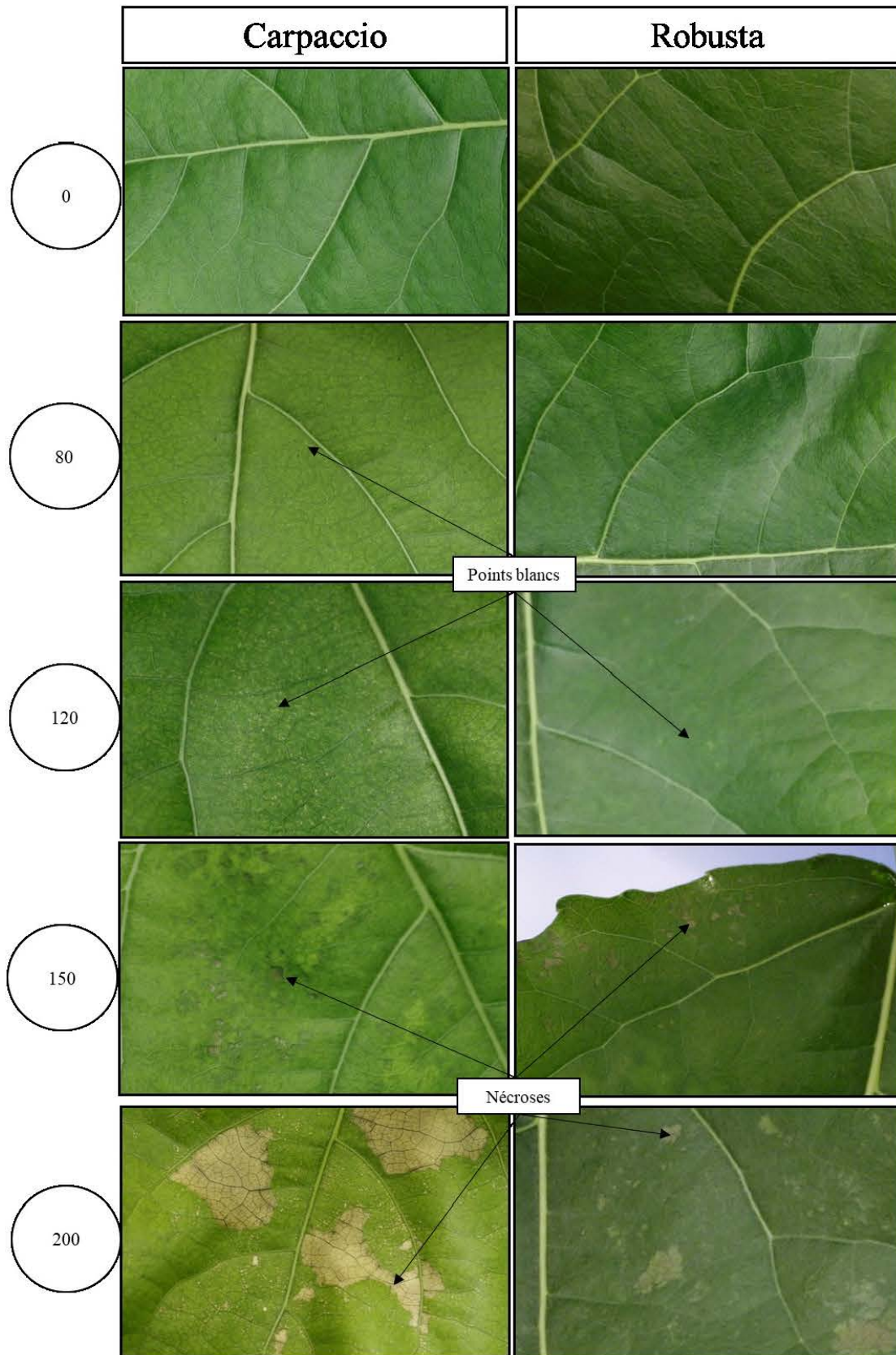


Figure 29 : Comparaison photographique du type de symptômes observés en fonction de la fumigation d'O<sub>3</sub> pour les deux géotypes Carpaccio et Robusta. Les chiffres à gauche correspondent à la dose d'O<sub>3</sub> en ppb.

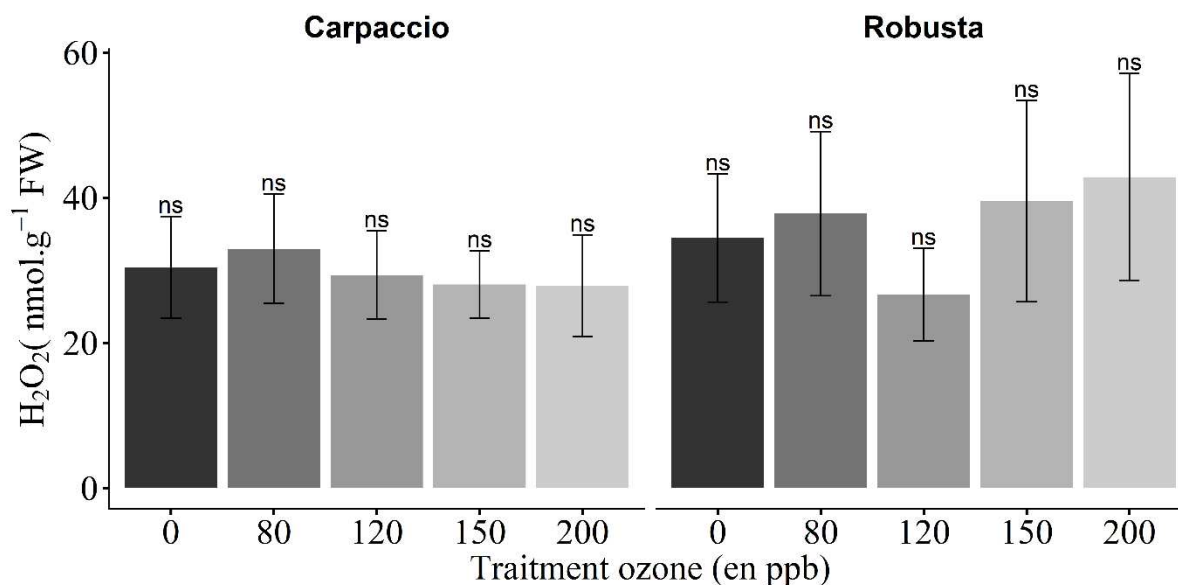


Figure 30 : Détermination du contenu en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La détermination a été réalisée à la fin de l'expérimentation pour les deux génotypes, Carpaccio et Robusta, soumis à 5 traitements O<sub>3</sub> de 0, 80 ,120 150 pendant 12 jours et 200 ppb pendant 8 jours.

### III.4. Discussion

#### III.4.1. Différences génotype-spécifiques

Les deux génotypes Carpaccio et Robusta se distinguent l'un de l'autre par des différences spécifiques importantes. En termes de croissance, Carpaccio a une croissance en hauteur nettement plus importante que Robusta. Cette différence de vitesse de croissance donne à voir de jeunes arbres de taille très différentes pour le même âge. Carpaccio présente également plus de feuilles que Robusta. Ces différences de croissance étaient d'ailleurs déjà rapportées dans la thèse de Dumont (2013). Une autre différence génotypique spécifique importante déjà signalée (Dumont, 2013) concerne les teneurs en chlorophylle : les feuilles suivies de Robusta tendent à contenir plus de chlorophylles par unité de surface que celles du génotype Carpaccio. Ces différences observées pourraient être expliquées par le choix de la feuille mesurée et les différences de développement entre les deux génotypes. En effet, la feuille retenue pour la mesure, si elle est pleinement développée en surface, elle pourrait ne pas mûrir de la même manière. Chez Carpaccio, du fait d'une croissance rapide, les feuilles pourraient mettre plus de temps pour se développer que chez Robusta, qui croît moins vite. Il en résulterait un temps de maturation des feuilles plus long pour Carpaccio que pour Robusta. Cette différence de maturation peut impacter la réponse à l'O<sub>3</sub> à l'échelle de la feuille. Probablement en lien avec les teneurs en chlorophylle, l'assimilation nette pour le CO<sub>2</sub> est plus élevée chez Robusta. Ces

différences spécifiques entre les deux génotypes doivent être prises en compte lors de l'interprétation de leur sensibilité à l'O<sub>3</sub>.

#### **III.4.2. Des différences de réponse à l'O<sub>3</sub> ?**

Pour les deux génotypes, la croissance en hauteur et en diamètre n'a pas été affectée par l'O<sub>3</sub>. Par contre, la biomasse totale a diminué, que ce soit pour Carpaccio ou Robusta. En effet, celle-ci est dépendante du nombre de feuilles. Or, on observe une chute de feuilles sous O<sub>3</sub> pour les deux génotypes, l'importance de cette chute étant proportionnelle à la concentration d'O<sub>3</sub> à laquelle les peupliers étaient exposés. Dans les thèses de Dghim (2012) et Dumont (2013), la chute des feuilles à 120 ppb avait été un argument déterminant de la sensibilité de Robusta. En testant plusieurs doses d'O<sub>3</sub>, nous nous attendions donc à observer des dommages croissant avec l'augmentation des concentrations et une différence entre génotypes. Il s'avère, en comparant les différentes doses d'O<sub>3</sub>, que la chute des feuilles n'est peut-être pas un aussi bon déterminant que précédemment estimé. En effet, Robusta est plus affecté que Carpaccio à 200 ppb, mais moins à 150 ppb. La réponse à l'O<sub>3</sub> par la chute des feuilles pour un génotype donné semble donc être dose dépendante.

De plus, nos résultats montrent des modifications d'échanges gazeux chez les deux génotypes. Ainsi, la conductance stomatique diminue sous O<sub>3</sub> et de manière plus importante en fonction de la croissance des concentrations en O<sub>3</sub>. Néanmoins, Carpaccio tend à davantage fermer ses stomates que Robusta. Cette observation est en accord avec les thèses de Dghim (2012) et Dumont (2013). Il est intéressant de noter également que la fermeture des stomates chez Carpaccio est proportionnelle à la concentration d'O<sub>3</sub>, résultant en un POD<sub>0</sub> identique pour les traitements 80, 120 et 150 ppb. En parallèle de cette fermeture importante des stomates, la photosynthèse diminue. Cette diminution est d'ailleurs plus importante chez Carpaccio que Robusta, ce qui pourrait être dû à une limitation plus importante des entrées de CO<sub>2</sub> chez Carpaccio. Enfin, pour les deux génotypes la baisse d'assimilation est accompagnée, chez les deux génotypes, d'une baisse de chlorophylles, due à de la dégradation ou à une diminution de la biosynthèse de ces pigments (Knudson et al., 1977).

Par ailleurs, il est connu que les anthocyanes, des pigments solubles dans l'eau et dérivés de flavonoïdes (composés phénoliques) via la voie de l'acide shikimique (Chalker-Scott, 2018), assurent un rôle de photoprotection lors de l'ontogenèse des feuilles (Hughes et al., 2018). C'est ainsi que dans les feuilles jeunes, la lumière est en excès par rapport à la capacité photosynthétique des chloroplastes immatures. Les anthocyanes dissipent l'excès d'énergie jusqu'à ce que les chlorophylles soient produites dans des chloroplastes matures. En condition

de développement normal, les anthocyanes vont diminuer lors de la synthèse des chlorophylles (Hughes et al., 2018). Cette observation est confirmée par nos résultats dans le traitement air filtré (0 ppb d'O<sub>3</sub>). Cependant en présence d'O<sub>3</sub>, les teneurs en anthocyanes diminuent moins rapidement au cours du développement de la feuille. En parallèle, les chlorophylles augmentent moins que chez le traitement contrôle, que ce soit à cause d'une dégradation due au stress oxydant ou d'une diminution de la synthèse des chlorophylles. Or, cette diminution de l'assimilation peut entraîner un excès d'énergie lumineuse. Les anthocyanes ont également un rôle antioxydant, notamment dans le cas d'expositions longues (Nagata et al., 2003). Les teneurs en anthocyanes de Robusta augmentent d'ailleurs à 200 et 150 ppb. Cette augmentation peut être le résultat de la mise en place de réponses de détoxification en réaction à l'O<sub>3</sub>.

Les flavonols, enfin, appartiennent à la famille des flavonoïdes et sont des composés phénoliques antioxydants (Agati et al., 2012). Nos résultats montrent une présence plus importante de flavonols sur la face abaxiale de la feuille. En effet, si les flavonols augmentent sur les deux faces en présence d'O<sub>3</sub>, l'augmentation est plus importante sur la face inférieure. Dans les travaux précédents, il avait été montré que pour Carpaccio et Robusta, la fermeture des stomates de la face supérieure est plus importante sous O<sub>3</sub> (Dumont, 2014). Les feuilles de peupliers étant amphistomatiques (i.e. les stomates sont présents sur les deux faces), l'augmentation significative de la présence de flavonols sur la face inférieure de la feuille pourrait donc être due à un flux d'O<sub>3</sub> entrant plus important, et donc à un stress oxydant plus fortement subi par cette même face.

De manière générale, la différence de flux d'O<sub>3</sub> entrant entre les deux génotypes permettrait d'expliquer partiellement les différences observées au niveau des flavonols et des anthocyanes. A flux d'O<sub>3</sub> entrant égaux, le contenu est identique entre les deux génotypes. Ainsi, Robusta ayant un POD<sub>0</sub> plus élevé que Carpaccio à un même temps d'exposition à l'O<sub>3</sub>, ses mécanismes antioxydants sont tout simplement stimulés plus précocement.

Ces conclusions auraient pu être appuyées par ceux du dosage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais la trop forte variabilité des résultats obtenus ne nous permet pas de les exploiter. Cette variabilité peut être due à la sensibilité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à différentes conditions expérimentales ou à l'interaction avec les métabolites antioxydants, comme décrits dans la section II.2.7.2.a du Matériels et Méthodes. De plus, l'ordre de grandeur des valeurs obtenues est relativement faible par rapport à ceux présentés dans d'autres travaux, ces derniers donnant à voir une grande variabilité (Queval et al., 2008).

### III.4.3. Deux stratégies différentes ?

Des marqueurs de la sensibilité des deux géotypes à l'O<sub>3</sub> sont présents : l'apparition de nécroses, la chute des feuilles, les modifications des échanges gazeux et des teneurs en pigments. Néanmoins, les deux géotypes semblent montrer des stratégies de réponse différentes face au gaz phytotoxique (Figure 31). En effet, les échanges gazeux et les pigments répondent au POD<sub>0</sub>. La teneur en chlorophylles et l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> diminue donc avec l'augmentation du POD<sub>0</sub> et il est intéressant de noter que la relation diffère pour les deux géotypes. Pour Carpaccio, la réponse est d'éviter le stress créé par l'O<sub>3</sub>. La fermeture des stomates est proportionnelle à la concentration à laquelle le peuplier est exposé, ce qui correspond à une stratégie d'évitement. Celle-ci semble très efficace à court terme pour limiter le stress oxydant, mais la diminution de la photosynthèse pourrait être déterminante en impactant la croissance sur le long terme. Pour Robusta, la fermeture des stomates est moins importante en présence d'O<sub>3</sub>. L'entrée du gaz se fait alors plus facilement, mais l'assimilation de carbone reste relativement élevée. Bien que Robusta fasse face à un stress oxydant plus important, l'assimilation du carbone est donc maximisée. Par ailleurs, si le géotype semble plus sensible vis-à-vis de la chute des feuilles, la diminution de la surface foliaire représente également une forme d'évitement. Cela soulève des interrogations concernant la remobilisation des ressources des feuilles les plus matures.

Fort de ces constats, nous pouvons donc en déduire qu'en fonction de la durée et de la dose d'exposition à l'O<sub>3</sub>, les stratégies des deux géotypes n'auront pas la même efficacité. Face à un stress aigu dû à une forte exposition à l'O<sub>3</sub>, Carpaccio apparaît plus « tolérant » que Robusta, car il évite plus rapidement le stress. Mais face à un stress chronique (exposition à de faibles concentrations d'O<sub>3</sub> sur un pas de temps long), Robusta semble plus résistant que Carpaccio, puisqu'il arrive à maintenir une meilleure assimilation de CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse et que ses pertes de biomasse, de chlorophylles ou de croissance ne sont pas pour autant plus importantes que Carpaccio. Ce dernier, s'il était exposé à un stress long, pourrait alors souffrir d'une limitation de la photosynthèse. Dans la réponse à long terme, la mise en place de mécanismes de détoxification efficaces pourrait donc être déterminante. D'après l'évolution des teneurs en flavonols et anthocyanes, la mise en place de tels mécanismes semble être dose dépendante chez le peuplier. L'induction des défenses antioxydantes est un aspect essentiel de la stratégie de réponse à un stress, mais nécessite une réallocation des ressources. Par conséquent, la sensibilité/résistance d'une plante est principalement déterminée par sa capacité à maintenir la photosynthèse, qui elle-même permet la croissance du végétal et le maintien des mécanismes

de défense, mais elle peut aussi être liée à une remobilisation des ressources qui, sur un temps court, permettront à la plante de résister. S'assurer de la résistance des plantes à un facteur environnemental, et donc assurer leur croissance et la production de biomasse dans des conditions de stress, représente un enjeu économique réel pour la sylviculture et l'agriculture. Pour autant, il convient de mettre en perspective la réponse de la plante observée dans cette partie. En effet, dans la nature, un végétal est rarement soumis à un facteur de stress seul. Les modèles climatiques prévoient non seulement une augmentation des concentrations d'O<sub>3</sub> troposphérique, mais également des périodes de sécheresse de plus en plus fréquentes et sévères dans le futur. Or, l'un des mécanismes de défense de la plante en réaction à un déficit hydrique est la fermeture des stomates, également en jeu dans les stratégies mises en place par la plante face à l'O<sub>3</sub>. Dès lors, il convient d'étudier l'impact qu'ont ces facteurs de stress simultanément ou successivement sur les mécanismes de réponse de la plante.

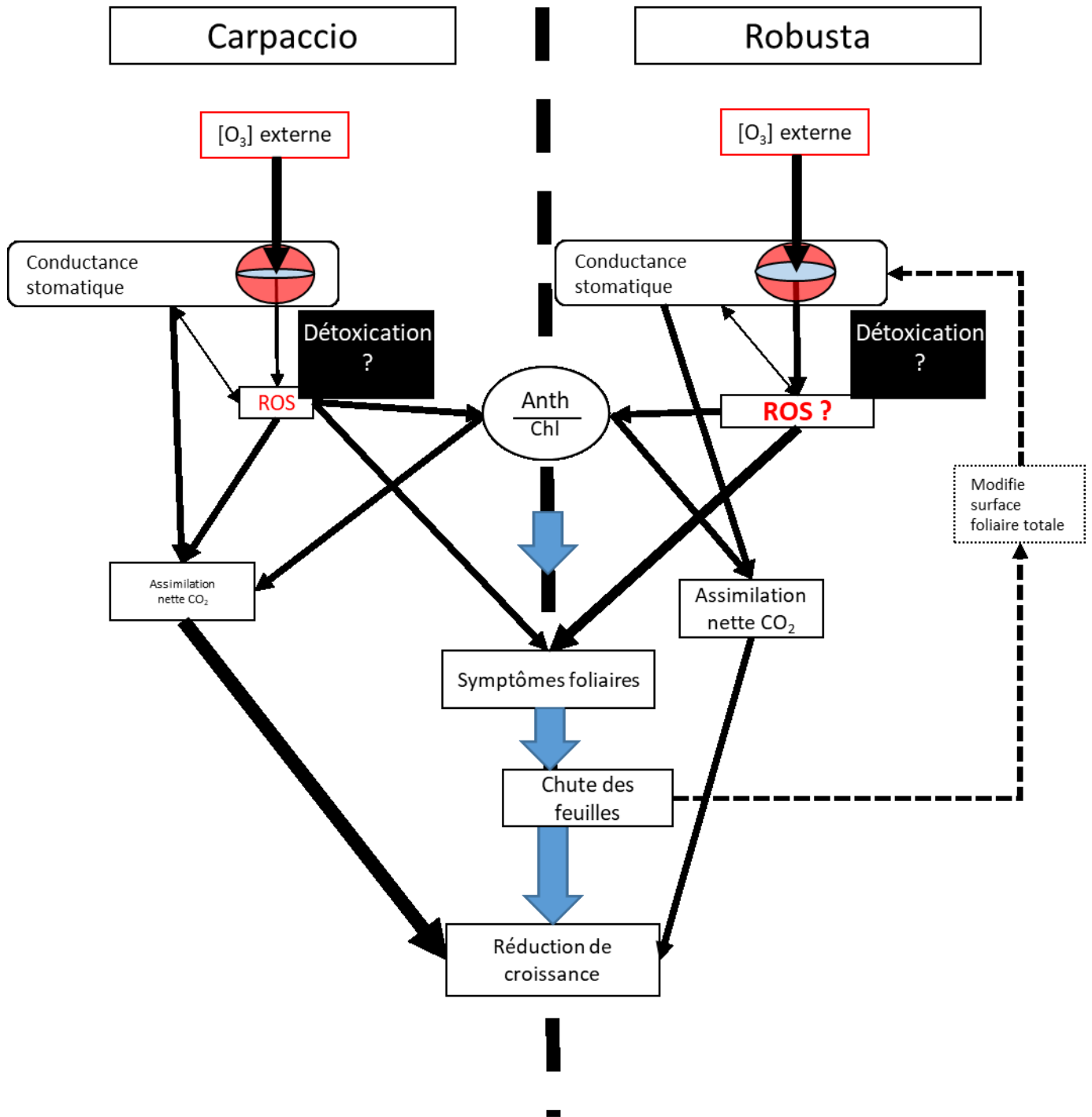


Figure 31 : Bilan schématique de la différence de réponse des deux génotypes de peupliers Carpaccio et Robusta soumis à l' $O_3$ . La taille des flèches illustre la force de l'effet. La taille du texte symbolise une augmentation ou une diminution du paramètre. Les paramètres représentés sur la ligne pointillée au centre du schéma ne permettent pas de différencier les deux génotypes.

## **Chapitre IV. Réponse du peuplier soumis à la combinaison simultanée de contraintes ozone et sécheresse**

---



## IV.1. Introduction

Dans des conditions naturelles, les épisodes de sécheresse et d'augmentation des concentrations d'O<sub>3</sub> troposphérique peuvent être concomitants. Cette combinaison de contraintes nécessite une attention particulière. En effet, en réduisant l'ouverture des stomates, la sécheresse peut limiter l'entrée de l'O<sub>3</sub> dans les feuilles. Cependant, en favorisant la fermeture des stomates, le déficit hydrique du sol limite également les apports de CO<sub>2</sub> nécessaire à la photosynthèse et augmente le risque de stress oxydant. La simultanéité des deux stress pourrait ainsi avoir un effet négatif (additif ou synergique) pour la plante ou bien un effet antagoniste dû à une tolérance croisée (Tausz et al., 2007).

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la réponse du peuplier en condition de combinaison simultanée de contraintes, à travers l'étude des similitudes et des différences existantes au sein même des mécanismes de réponse mis en place au niveau de la régulation stomatique, de la signalisation et de la détoxification cellulaire pour faire face au déficit hydrique, à l'O<sub>3</sub> ou à une combinaison des deux stress.

Pour apporter des éléments de réponse à cette question, le chapitre sera divisé en trois parties.

La première partie correspond à une étude publiée impliquant les deux génotypes de peupliers (Carpaccio et Robusta) soumis à différents traitements pendant 17 jours :

- un déficit hydrique modéré et progressif de 60 % à 30 % de REW
- une exposition à 120 ppb d'O<sub>3</sub>
- la combinaison des deux traitements précédents

Les objectifs sont i) d'identifier si la sécheresse modifie la réponse du peuplier due à l'O<sub>3</sub> et vice et versa, et ii) de savoir s'il existe une différence de réponse entre les 2 génotypes. Pour répondre à ces interrogations, les réponses antioxydantes du peuplier seront étudiées à travers le cycle ascorbate-glutathion (teneurs en ascorbate et glutathion, activités enzymatiques et expression des isoformes des principales enzymes permettant leur régénération).

La deuxième partie apportera des éléments de réflexion supplémentaires concernant le dosage des pools d'ascorbate et glutathion, grâce au développement, pendant la thèse et à l'issue d'une collaboration internationale, du dosage de l'AsA et du GSH par HPLC. Cette partie sera donc une digression utile pour comprendre l'effet de la combinaison de contraintes sur les capacités de détoxification des arbres. En effet, l'étude de trois espèces de chênes soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou à la sécheresse sur un dispositif O<sub>3</sub>-FACE (*Free-air concentration enrichment*) apporte des éléments supplémentaires permettant de mieux comprendre les mécanismes de détoxification mis en place.

Pour finir, la troisième partie présentera une prospection des voies de signalisation hormonale mises en place par le géotype Robusta, soumis à différents traitements pendant 11 jours :

- un déficit hydrique modérée à 45 % de REW
- une exposition à 120 ppb d'O<sub>3</sub>
- la combinaison des deux traitements précédents

Les objectifs sont i) d'explorer la réponse hormonale sous O<sub>3</sub> et déficit hydrique seuls et ii) de déterminer s'il existe une différence de réponse en combinaison de stress. Pour répondre à ces questions, un profilage hormonal a été réalisé en collaboration avec le *Laboratory of Hormonal Regulations in Plants*, Prague, République tchèque.

## **IV.2. Analyse intégrative de la détoxification de 2 génotypes de peuplier soumis à l'ozone et la sécheresse: Focus sur le cycle ascorbate-glutathione**

Les résultats ont été publiés dans la revue *Science of The Total Environment* :

Dusart N., Gérard J., Le Thiec D., Collignon C., Jolivet Y., Vaultier M.-N., 2019. *Integrated analysis of the detoxification responses of two Euramerican poplar genotypes exposed to ozone and water deficit: Focus on the ascorbate-glutathione cycle.*

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.367>

### **Abstract**

Ozone (O<sub>3</sub>) and drought increase tree oxidative stress. To protect forest health, we need to improve risk assessment, using metric model such as the phytotoxic O<sub>3</sub> dose above a threshold of  $y \text{ nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (POD<sub>y</sub>), while taking into account detoxification mechanisms and interacting stresses. The impact of drought events on the effect of O<sub>3</sub> pollution deserves special attention. Water deficit may decrease O<sub>3</sub> entrance into the leaves by reducing stomatal opening; however, water deficit also induces changes in cell redox homeostasis. Besides, the behaviour of the cell antioxidative charge in case of stress combination (water deficit and O<sub>3</sub>) still remains poorly investigated. To decipher the response of detoxification mechanisms relatively to the Halliwell-Asada-Foyer cycle (HAF), we exposed poplar saplings (*Populus nigra x deltoides*) composed of two genotypes (Carpaccio and Robusta), to various treatments for 17 days, i.e. i) mild water deficit, ii) 120 ppb O<sub>3</sub>, and iii) a combination of these two treatments. Ozone similarly impacted the growth of the two genotypes, with an important leaf loss. Water deficit decreased growth by almost one third as compared to the control plants. As for the combined treatment, water deficit protected the saplings from leaf ozone injury, but with an inhibitory effect on growth. The pool of total ascorbate was not modified by the different treatments, while the pool of total glutathione increased with POD<sub>0</sub>. We noticed a few differences between the two genotypes, particularly concerning the activity of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase relatively to POD<sub>0</sub>. The expression profiles of genes coding for the dehydroascorbate reductase and glutathione reductase isoforms differed, probably in link with the putative localisation of ROS production in response to water deficit and ozone, respectively. Our result would argue for a major role of MDHAR, GR and glutathione in the preservation of the redox status.

### IV.2.1. Introduction

Global warming is expected to cause wet regions to become wetter and dry regions drier (Liu & Allan, 2013). The models including an increase in temperature and vapor pressure deficit (VPD) in the warm season in addition to lower rainfall in the cold season predict an increased probability of future drought events (Park Williams et al., 2013). Drought link with an increase of forest stand mortality was already reported, along with a greater risk of forest decline (Allen et al., 2010). Water deficit is known to reduced gas exchanges and plant biomass (Chaves et al., 2003; Monclus et al., 2006). Better predicting the impact of drought on forests requires further research on the molecular and physiological mechanisms underlying plant responses and tolerance (Chaves et al., 2003; Rengel et al., 2012).

Moreover, trees have to deal with atmospheric pollution like ozone pollution. Tropospheric ozone ( $O_3$ ) is a phytotoxic air pollutant that can damage plant cells due to its strong oxidative power (Baier et al., 2005). Plants exposed to a large amount of  $O_3$  gas show macroscopic symptoms like chlorosis or necrosis (Vollenweider et al., 2003). Moreover, the photosynthetic assimilation rate and growth both decrease (Wittig et al., 2007), and as a result the net primary production of forests decreases too (Proietti et al., 2016; Subramanian et al., 2015). A geographical analysis of tropospheric ozone showed that the ozone monthly average concentration is currently stable (Oltmans et al., 2013) even though differences are visible on a local scale. From 2000 to 2014, tropospheric ozone concentration trends decrease in North America, stabilise in Europe and increase in Asia (Gaudel et al., 2018; Mills et al., 2018).

In natural environments, it is well admitted that drought events are frequently linked to heat and low cloud cover in the summer time. These conditions are optimal for the photochemical reaction responsible for ground-level ozone production to be triggered. Therefore, it is obvious that trees will have to cope with more frequent episodes of combined drought and tropospheric ozone in the future. In this context, while plant responses to these constraints applied separately have been extensively studied, a general understanding of the effects of the combination of such constraints is still lacking (Matyssek et al., 2012). Stomatal closure can be expected under water deficit, hampering ozone entrance into the leaf, and resulting in a kind of “protective effect” of water deficit. This protective or antagonistic effect was observed in birch in control chamber (Pääkkönen et al., 1998), in *Picea abies* (Kronfuß et al., 1998), *Fagus sylvatica* (Dixon et al., 1998) and more recently in poplar (Gao et al., 2017). Besides, the biomass of Norway spruce submitted to water deficit decreased as a result of simultaneous ozone treatment (Dixon et al., 1998). A synergistic effect with a disturbance of stomatal closure occurred in similar conditions

of combined ozone and drought (Bohler et al., 2013; Pollastrini et al., 2014). Furthermore, combined drought and ozone could affect signalling pathways and impact crosstalks between physiological and metabolic adjustments, e.g. in *Quercus sp.* (Cotrozzi et al., 2017a, 2017b; Pellegrini et al., 2019). Combined stresses may have a worse impact on plants or a cross-tolerance effect (Tausz et al., 2007).

Most abiotic constraints result in oxidative stress for the cells. The formation of reactive oxygen species (ROS) could induce an uncontrolled oxidative rate exceeding the metabolic capacity of the plant (Foyer & Noctor, 2011; Noctor et al., 2014). At the leaf scale, ozone damage occurs when the instantaneous stomatal ozone uptake of leaves overwhelms the ability of the leaf to detoxify ozone. Cell homeostasis is disrupted, and the increase in ROS leads to cell death. Among abiotic stress factors, O<sub>3</sub> and drought admittedly produce oxidative stress (Edreva, 2005; Iriti & Faoro, 2007). Plants have two defence levels for both constraints (Castagna & Ranieri, 2009). The first is avoidance *via* stomatal closure. Regarding drought, this action limits evapotranspiration and in turn water loss. As for O<sub>3</sub>, this strategy prevents the gas from entering the leaf. Nevertheless, in both cases it is necessary for the plant to keep letting CO<sub>2</sub> in because it is essential for photosynthesis. The second level of defence gathers all the detoxification and cell repair processes. The present study focuses on glutathione (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), a major antioxidant. GSH cannot be dissociated from ascorbate (ASC, L-threo-hexenon-1,4-lactone), the most important antioxidant in plants. Both compounds differ from other antioxidants for three reasons. Firstly, specific enzymes like ascorbate peroxidase or glutathione peroxidase couple them to the peroxide metabolism. Secondly, oxidised forms of glutathione and ascorbate are relatively stable. Thirdly, they can be recycled by enzymes using NADPH as a reductant. Foyer and Noctor (2011) considered these three properties to define the ascorbate-glutathione cycle as “the heart of the redox hub”. Even though ascorbate is considered as the major antioxidant in plant cells, its reaction with ROS in the apoplasm and the symplasm is not sufficient to explain the differences between poplar genotypes in response to O<sub>3</sub> (Ranieri et al., 1999; Van Hove et al., 2001).

Among fast-growing tree species, poplar has a substantial economic interest. Nevertheless, its culture requires large amounts of water, and it is relatively drought-sensitive (Monclus et al., 2006; Silim et al., 2009). As a plant model, poplar species have been intensively studied under ozone exposure. Different species or genotypes showed distinct responses to ozone regarding leaf damage, biomass loss, stomatal behaviour, detoxification, and carbon allocation (Hu et al., 2015; Jolivet et al., 2016; Renaut et al., 2009). Understanding poplar responses to

environmental factors is an important issue for future wood biomass production. Genotype selection will have to focus on genotypes combining an optimal water use with maximum biomass production (Isebrands & Richardson, 2013). The present article investigates the responses to ozone or/and water deficit of Carpaccio and Robusta, two genotypes of Euramerican poplar (*Populus deltoides* x *Populus nigra*). These two genotypes were previously selected by our team based on their different responses to ozone as regards the stomatal response and NADPH regeneration (Dghim et al., 2013; Dumont et al., 2013). Moreover, O<sub>3</sub> had strong effects on gene expression, especially the genes responsible for glutathione biosynthesis, and on the GSH content in the two genotypes (Dumont et al., 2014b).

Our specific goals were to determine whether water deficit could modify the ozone-induced physiological response of poplar and *vice versa*, and whether a difference in detoxification processes could explain different responses of each genotype. We would expect that ozone and water deficit interaction could impact trees in three different ways (Bansal et al., 2013; Matyssek et al., 2006; Pääkkönen et al., 1998): i) an additive effect, corresponding to the expected theoretical addition of the effects of each single stress; ii) an antagonistic effect, corresponding to a lower impact of the additive one; iii) a synergistic effect, greater than the expected additive one. These effects could differ according to the parameters taken into account. To do that, we investigated the ascorbate and glutathione contents and the redox balance, with special focus on the three enzymes implied in ascorbate and glutathione regeneration, i.e. i) monodehydroascorbate reductase (MDHAR), ii) dehydroascorbate reductase (DHAR), and iii) glutathione reductase (GR). Changes in gene expression coding for DHAR and GR isoforms were also investigated.

## **IV.2.2. Materials and methods\***

### **IV.2.2.1. Plant material and exposure conditions**

Cuttings of two Euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides* x *Populus nigra*: 'Carpaccio' and 'Robusta') were planted in five-liter pots filled with loam (N/P/K 14/16/18, 1.2kg m<sup>-3</sup>, Gramoflor SPI Universel), fertilised by adding 5 g of slow-release nutritive granules (Nutricot T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertel, Boulogne-Billancourt, France). The experiment was first conducted for 3 weeks on Robusta and was later duplicated on Carpaccio. The plants were grown in growth chambers for 5 weeks at 75/85 % relative humidity (day/night) with a 14-hour light period (300 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD at mid-leaf height from 08:00 to 22:00) and a temperature

---

\* N.D.A : Cette partie étant incluse dans l'article en anglais, elle est redondante avec le Chapitre II :Matériels et méthodes, excepté pour le Tableau 5 qui apporte des éléments nouveaux sur les gènes étudiés.

of 23/20 °C. Sixty-four plants were randomly distributed in eight phytotron chambers with growth conditions identical to those in the growth chamber; half of them were set for O<sub>3</sub> treatment (120 nmol.mol<sup>-1</sup> for 13 hours). At the end of a 7-day long acclimation period, the 17-day-long O<sub>3</sub> treatment started, while control saplings were exposed to charcoal-filtered air. O<sub>3</sub> was produced from pure O<sub>2</sub> with two ozone generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected directly into the chambers one hour after the beginning of the photoperiod until its end. A set of analysers (O341M; Environment S.A., Paris, France) was used to monitor O<sub>3</sub> concentrations. Half of the saplings were submitted to water deficit. Soil moisture was determined with a TDR probe (Trime-Fm, IMKO GmbH, Ettlingen, Germany) and related to pot weight. Poplars were watered every day at 15.00, after weight measurements. For the well-watered treatment, poplars were irrigated at 85 % of relative extractable water (REW). For the water deficit treatment, irrigation was set to 55% of REW the first week, and then at 35% of REW until the end of the experiment. The number of leaves, the diameter at the collar, and height were recorded on each individual twice a week until the end of the experiment.

#### **IV.2.2.2. Gas exchange measurements and POD<sub>0</sub> calculations**

Net CO<sub>2</sub> assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour (g<sub>w</sub>) were performed using a portable photosynthesis system (Li-6200, Li Cor, Lincoln, NE, USA) inside the phytotronic chamber (under phytotronic microclimate conditions). Measurements were carried out 3 times a week, one hour after light was switched on. Gas exchanges were measured on the first fully expanded leaves (the 10<sup>th</sup> leaf from the apex) at the beginning of the treatment. The air flow in the leaf chamber was set to 450 μmol.s<sup>-1</sup>. Measurements were made for 30 seconds after stabilisation. g<sub>w</sub> measurements allowed to estimate the Phytotoxic Ozone Dose above a threshold flux of 0 nmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (POD<sub>0</sub>), according to Bagard et al. (2015).

#### **IV.2.2.3. Leaf sampling**

Fully expanded leaves were sampled on days 2, 11, and 17 after the beginning of fumigation. Two leaves located next to each other (the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> leaves at the beginning of the treatment) were sampled *per* sapling and *per* chamber. Midribs and petioles were cut off from the foliar limb using a razor blade, and the leaf material was rapidly frozen in liquid nitrogen and immediately stored at -80°C. Leaves were ground to a fine powder with a mortar and pestle in liquid N<sub>2</sub>. The leaf powder was stored at -80°C until further analyses.

#### **IV.2.2.4. Enzymatic activity assays**

##### *IV.2.2.4.a. Extraction, filtration, and protein determination*

Fifty mg of leaf powder extract were ground with 1.3 mL of cold extraction buffer containing 10% (w/w) of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 100 mM Bicine–KOH (pH 7.5), 6% (w/w) of PVP 25, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10% (v/v) of glycerol, and 0.28% (v/v) of a protease inhibitor mixture. Crude extracts were then centrifuged at 20,000 x g for 20 min at 4°C. One mL of each supernatant was filtered through a column (PD MiniTrap G25) equilibrated with 100 mM bicine–KOH buffer (pH 7.8) and containing 10% (v/v) of glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM DTT. All the extraction steps were performed at 4°C. The filtered extracts were stored at –80°C until analysis. Total soluble proteins were determined using Bradford's Coomassie Blue G250 method (1976), with bovine serum albumin as a standard.

##### *IV.2.2.4.b. Dehydroascorbate Reductase (DHAR, EC 1.8.5.1) assay*

DHAR activity was measured as described by Hossain and Asada (1984), with slight modifications. The reaction was monitored in microplates in a final volume of 200 µL containing 100 mM HEPES-KOH buffer pH 7, 2.5 mM reduced glutathione (GSH), 1 mM EDTA, 0.2 mM DHA, and 5 µL of desalted extract. The reaction was monitored at 265 nm, at 25°C, and initiated by adding DHA. The non-enzymatic reaction of GSH was taken into account and the activity was corrected by multiplying the values by 0.98 (correction due to absorbance of GSSG at 265 nm) (Asada, 1984). Four technical replicates *per* biological sample were performed. DHAR activity was expressed as nkat of ascorbate produced.mg<sup>-1</sup> protein.

##### *IV.2.2.4.c. Monodehydroascorbate reductase (MDHAR, EC 1.6.5.4) assay*

MDHAR activity was measured as described by Hossain and Asada (1984), with slight modifications. The reaction was monitored in microplates in a final volume of 200 µL containing 50 mM HEPES-KOH buffer pH 7.6, 2.5 mM L-ascorbate (ASA), 0.2 mM NADPH, and 50 µL of filtrated extract. After incubation 10 min at 25°C, the reaction was initiated by adding 0.028 unit of ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3), and the absorbance was monitored at 340 nm for 5 min. A correction was made to take into account NADPH oxidation in the absence of ASA oxidase. Three technical replicates *per* biological sample were performed. MDHAR activity was expressed as nkat of oxidised NADPH.mg<sup>-1</sup> protein.

##### *IV.2.2.4.d. Glutathione Reductase (GR, EC 1.6.4.2) assay*

GR activity was measured following the method of Foyer and Halliwell (1976). The reaction was monitored at 30°C in microplates in a final volume of 200 µL containing 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.8, 1 mM glutathione disulfide (GSSG), 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, and



20  $\mu\text{L}$  of filtrated extract containing 2 mM DTT. The reaction was initiated by adding NADPH, and monitored for 15 min at 340 nm. A correction was made to take into account NADPH oxidation in the absence of GSSG. Three technical replicates *per* biological sample were performed. GR activity was expressed as nkat of oxidised NADPH. $\text{mg}^{-1}$  protein.

#### **IV.2.2.5. Ascorbate and Glutathione Determination**

Ascorbate and glutathione were determined by spectrophotocemical methods adapted from Queval and Noctor, (2007). The method is based on AsA absorbance at 265 nm and on its oxidation by ascorbate oxidase (AO). The reduced form was measured without pretreating the extract. Total ascorbate was determined after reduction of DHA and MDHA by dithiothreitol (DTT). Three technical replicates and a standard curve were monitored in each UV microplate. Glutathione and glutathione disulphide determination were performed on the same extracts in accordance with Griffith (1980), using the spontaneous reaction with 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) that produces 2-Nitro-5-thiobenzoic acid (TNB). TNB absorbance was measured at 412 nm. This allowed for the direct measurement of total glutathione through the reduction of GSSG to GSH by GR. GSSG was determined alone after pre-treating the extracts with 2-vinylpyrimidine (VPD). VPD was used to remove GSH from the extracts. Standard curves for GSH and GSSG were monitored from each UV microplate.

#### **IV.2.2.6. Gene analysis**

##### *IV.2.2.6.a. RNA isolation and cDNA synthesis*

One hundred mg of leaf powder were used for RNA extraction. RNA was extracted from the leaves using an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A DNase treatment was applied using a DNA-free kit (Ambion). Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was used to prepare cDNA samples using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). The cDNAs were diluted to 1/10 with nuclease-free water.

##### *IV.2.2.6.b. Real-Time RT-PCR Experiments*

Transcript levels were assessed by quantitative Real-time-PCR using SYBR Green master mix (Bio-Rad) according to the manufacturer's recommended protocol. Real-time PCR was performed in a MyiQ<sup>TM</sup> Single-Color Real-Time PCR Detection System ICycler (Biorad) in a 96-well reaction plates, with annealing temperatures of 58°C, and no-template controls were included. Three technical replicates were performed for each sample. The primer sequences used for all target genes are presented in Tableau 5. To check that the fluorescence signal was derived from the single intended amplicon in the following runs, a melting curve analysis was added to each PCR program. Crossing threshold values (Ct) were obtained using IQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software v2.0 (Bio-rad).

#### IV.2.2.6.c. Real-Time RT-PCR data analysis

Crossing threshold values (Ct) and PCR efficiency were used to calculate expression levels using the comparative delta-delta-Ct method improved for normalisation with several reference genes (Hellemans et al., 2007). All real-time RT-PCR results are means from four independent biological replicates. For each independent biological replicate, the relative transcript amount was calculated as the mean of three technical replicates. The best reference gene was chosen using GeNorm (Vandesompele et al., 2002).

Tableau 5 : Characteristics of the genes and primer sequences used for qPCR analyses. *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana* gene names were obtained from *P. trichocarpa* annotation v3.0 on assembly v3 (JGI), and from *Arabidopsis thaliana* TAIR10 v12.1.5 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Primer sequences and amplicon lengths (L) were designed using Primer3 software (<http://primer3.ut.ee>). Protein localisation came from the literature.

Gene of interest	Alias	Transcript Name	Primer (Forward/Reverse)	L(pB)	Localisation	A. thaliana homologue	References
Dehydroascorbate reductase	<i>DHAR1</i>	Potri.017G125100	ACAGACAGCCACGCAATCAA AAAGCAGCAGAGTGGTTCGT	163	Chloroplastic	At5g16710 ( <i>DHAR3</i> )	Lallement et al. 2016
	<i>DHAR2</i>	Potri.010G211600	TGAGGACGTTCTGCAACTTC TCTCTGGCTTCCTAGCTGAG	125	Cytosolic	At1g75270 ( <i>DHAR2</i> )	Rahantaniaina et al., 2017a
	<i>DHAR3</i>	Potri.008G049300	AATGGCTTTAGAGATCTGTG GAGGTTTATCACCCAGATTG	146	Cytosolic	At1g19570 ( <i>DHAR1</i> )	Tang & Yang, 2013a
Glutathione reductase	<i>GRI.1</i>	Potri.001G050000	TAGGGCTCAACGACCAGCTA ACACCACTGCACGCTTAGGC	95	Cytosolic	At3g24170 ( <i>GRI</i> )	Rouhier et al., 2006
	<i>GRI.2</i>	Potri.003G178200	TAAGGCTCAGCGTCCCAATA GCACTACTGCACGCTTTGGT	95	Cytosolic	At3g24170 ( <i>GRI</i> )	
	<i>GR2</i>	Potri.015G037800	TCTTCTGTTGCCGTGTGTGA ACACATCCACGAAGCACACA	92	Chloroplastic	At3g54660 ( <i>GR2</i> )	
Glutathione synthase	<i>GSH25</i>	Potri.005G038100	GCCCGAGCTATTTGTGATGA GGGTGAAACAGCAGGAAAGA	157	-	At5g27380	Dumont et al., 2014
Gene of reference	<i>GUTI</i>	Potri.002G127700	GCGGAAAGAAAACTGCAAG TGACAGCACAGCCCAATAAG	127	-	At4g33380	Gutierrez et al., 2008

#### *IV.2.2.6.d. Statistical Analyses*

Statistical analyses were performed and figures were drawn using R 3.1.0 (R Development Core Team) open software. Growth parameters were studied using ANOVA on a linear model including the effects of water deficit, O<sub>3</sub> and genotype with *nlme* packages (Pinheiro et al., 2018). Enzymatic activities and antioxidant contents were explored in the same way but the tests were performed for each genotype separately and included time. Multiple comparisons were performed with *emmeans* (Lenth, 2016). Gas exchange data were fitted with a linear mixed-effect model using the *lme4* package (Douglas Bates et al., 2015) with biological replicates as a random variable, whereas water deficit, O<sub>3</sub> and time were fixed variables. Heteroscedasticity and variance homogeneity were assumed from the residual plot of the model. Figures were drawn with *ggplot2* (Wickham, 2009).

### **IV.2.3. Results**

#### **IV.2.3.1. Growth, leaf fall, and biomass**

The growth of the two genotypes differed all along the experiment: Carpaccio grew twice as fast as Robusta in height but not in diameter (Tableau 6). This difference in height was already established at the beginning of the treatment (data not shown). As for root biomass, it was higher in Robusta than in Carpaccio. Despite these differences in growth in control conditions, both genotypes showed similar trends in their response to stress factors. Firstly, in well-watered conditions (WW), O<sub>3</sub> *per se* did not impact height but reduced diameter growth by the same range (-25 %) in both genotypes. In this condition, an important leaf fall occurred to a similar extent for both genotypes (around 30% as compared to the control treatment). The decrease in leaf biomass at the end of the O<sub>3</sub> treatment reached 20% for both genotypes, mainly as a result of leaf loss (Tableau 6). Nevertheless, leaves started to fall from Robusta on the 7<sup>th</sup> day and from Carpaccio on the 13<sup>th</sup> day (data not shown). By contrast, in response to water deficit (D:AF), height growth and diameter growth were simultaneously impacted in both genotypes (Tableau 6): height growth decreased by 30% and diameter by 25% in both Carpaccio and Robusta relatively to WW:AF plants. Leaf loss started as early as the beginning of the treatment (d 2). At the end of the water deficit treatment, losses were -19% and -14% relatively to the WW:AF treatment for Carpaccio and Robusta, respectively. Shoot biomass decreased by 32% and 28% in Carpaccio and Robusta, respectively (Tableau 6). Root biomass slightly decreased under the water deficit treatment in Carpaccio (-22%), and more severely in Robusta (-37%) as compared to WW condition. In response to the interaction of stress factors (D:O<sub>3</sub>, p<0.05), there was an additional inhibitory effect on diameter growth as compared to D:AF mainly observed in

Carpaccio (-44% as compared to WW:AF). On the other hand, water deficit alleviated the effect of O<sub>3</sub> on Carpaccio foliage (twice as few fallen leaves under D:O<sub>3</sub> as compared to WW:O<sub>3</sub>), but not in Robusta (same leaf loss as WW:O<sub>3</sub>, interaction water deficit x ozone x genotype, p<0.001). The impact of the D:O<sub>3</sub> treatment on biomass was the same as the impact of the D:AF treatment for both genotypes.

Tableau 6 : Impact of water deficit or/and ozone on growth parameters in the Carpaccio and Robusta genotypes. Height and diameter are represented by a delta of growth between the end and the beginning of each treatment (day 18 – day 0). Leaf number and organ biomass were measured at the end of the treatment period. Means ± se, n= 16. Asterisks show the significance of factors/interactions: ‘\*\*\*’ P≤0.001, ‘\*\*’ P≤0.01, ‘\*’ P≤0.05, ‘ns’ non-significant. AF: air-filtered; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Genotype	Water t.	Ozone t.	Height		Diameter		Number of leaves		Biomasse		Root/Shoot	
			(Δd in cm)		0d	18d	Leave (g DW)	Shoot (g DW)	Root (g DW)			
Carpaccio	WW	AF	64.2 ± 1.1	0.30 ± 0.02	32 ± 0.8	49 ± 0.9	24.32 ± 1.44	15.61 ± 1.08	1.93 ± 0.19	0.052 ± 0.008		
		O <sub>3</sub>	67.0 ± 1.6	0.23 ± 0.02	33 ± 0.8	34 ± 0.7	20.14 ± 1.05	15.27 ± 1.00	1.62 ± 0.15	0.045 ± 0.005		
	D	AF	45.0 ± 0.7	0.23 ± 0.01	31 ± 0.7	39 ± 0.8	15.52 ± 0.87	10.63 ± 0.70	1.51 ± 0.18	0.053 ± 0.007		
		O <sub>3</sub>	46.8 ± 0.9	0.17 ± 0.01	32 ± 0.8	38 ± 0.5	15.35 ± 0.57	10.68 ± 0.60	1.38 ± 0.11	0.055 ± 0.006		
Robusta	WW	AF	29.4 ± 1.1	0.33 ± 0.01	21 ± 0.7	30 ± 0.8	12.62 ± 0.73	4.53 ± 0.39	2.54 ± 0.32	0.158 ± 0.040		
		O <sub>3</sub>	30.7 ± 0.8	0.24 ± 0.02	21 ± 0.5	20 ± 0.7	10.18 ± 0.54	4.51 ± 0.29	2.57 ± 0.38	0.163 ± 0.036		
	D	AF	18.1 ± 0.6	0.19 ± 0.02	21 ± 0.4	25 ± 0.6	9.26 ± 0.59	3.52 ± 0.27	1.61 ± 0.18	0.125 ± 0.024		
		O <sub>3</sub>	19.2 ± 1.2	0.18 ± 0.01	21 ± 0.5	20 ± 0.7	8.35 ± 0.59	3.56 ± 0.33	1.84 ± 0.20	0.160 ± 0.071		
Water Deficit			***	***	ns	***	***	***	***	ns		
Ozone			*	***	ns	***	**	ns	ns	ns		
Genotype			***	ns	***	***	***	***	**	***		
Water Deficit : Ozone			ns	*	ns	***	*	ns	ns	ns		
Water Deficit : Genotype			***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns		
Ozone : Genotype			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
Water Deficit : Ozone : Genotype			ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns		

Finally, after 18 days, Robusta and Carpaccio appeared similarly impacted by O<sub>3</sub>, with an important leaf loss. Under water deficit, the differences between the two genotypes were greater, with a stronger effect observed in the shoots of Carpaccio and in the roots of Robusta. Under combined treatment and considering the growth parameters (stem diameter or leaf biomass), water deficit did not limit the effect of O<sub>3</sub>, and amplified the effects observed under the constraints applied separately in both genotypes.

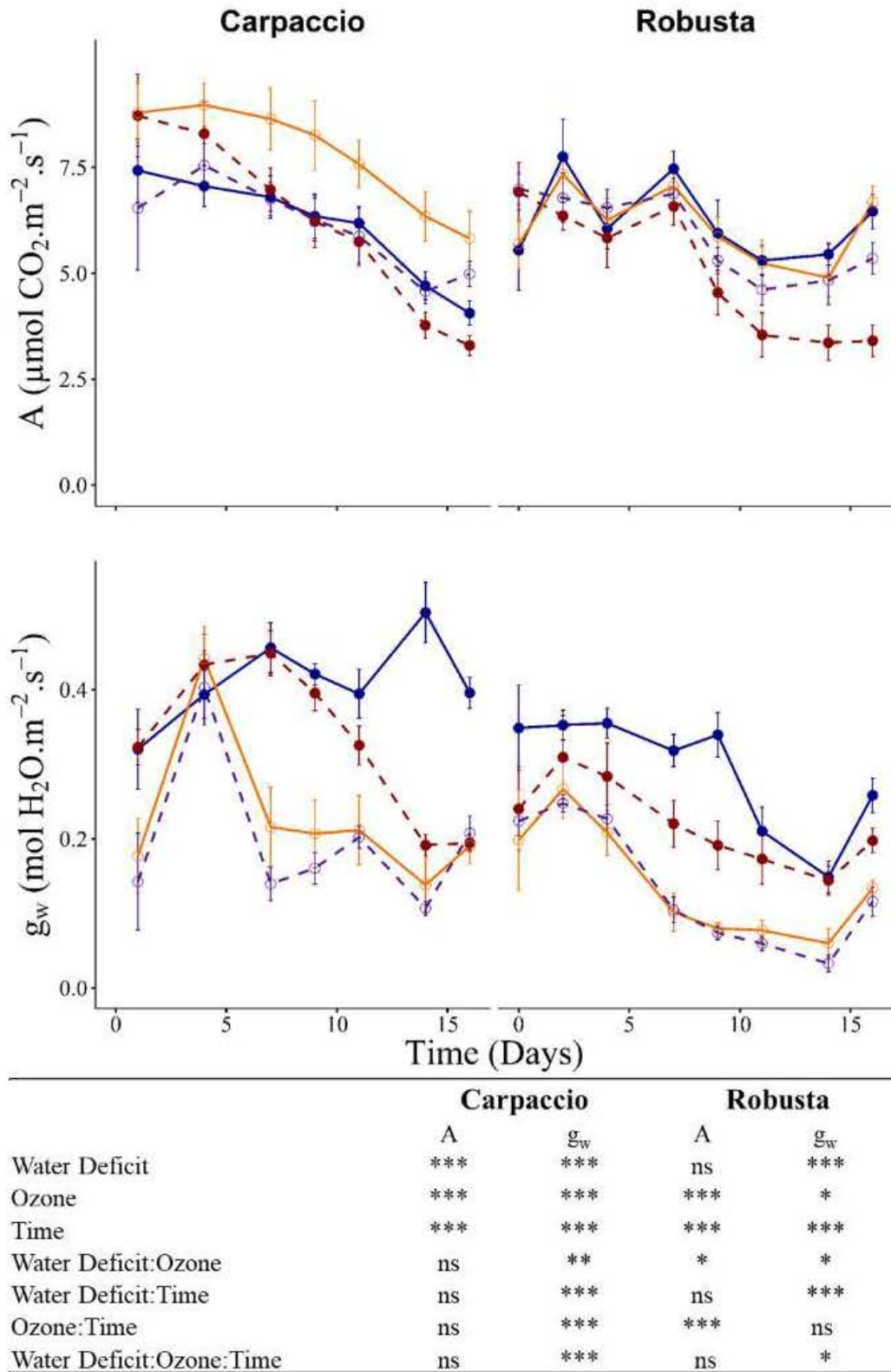


Figure 32 : Impact of ozone or/and water deficit on net CO<sub>2</sub> assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour ( $g_w$ ). Measurements were conducted on leaves of the Carpaccio and Robusta genotypes at different treatment times. Means  $\pm$  se,  $n \geq 4$ . AF: solid line (WW-AF: blue, and D-AF: orange), and O<sub>3</sub>: dashed line (WW-O<sub>3</sub>: red and D-O<sub>3</sub>: purple). Asterisks show the significance of factors/interactions: '\*\*\*'  $P \leq 0.001$ , '\*\*'  $P \leq 0.01$ , '\*'  $P \leq 0.05$ , 'ns' non-significant. AF: air-filtered; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

#### IV.2.3.2. *Gas exchanges*

Gas exchanges ( $A$ , net  $\text{CO}_2$  assimilation;  $g_w$ , stomatal conductance to water vapour) were monitored every 3 days all along the experiment (Figure 32). The photosynthetic assimilation measured in the growth chamber conditions tended to globally decrease in all conditions for both genotypes (Figure 32). This decrease was probably linked with a shade effect due to sapling growth. In Carpaccio, the mean varied from  $9 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  at the beginning of the experiment to  $5 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  after 16 days. Nevertheless, the decrease was more pronounced in the saplings exposed to WW: $\text{O}_3$ . This  $\text{O}_3$  effect was clearly visible in Robusta from the 9<sup>th</sup> to the 16<sup>th</sup> day of treatment. Water deficit did not modify  $\text{CO}_2$  assimilation by Robusta. Carpaccio saplings under water deficit had a higher net  $\text{CO}_2$  assimilation as compared to the well-watered saplings, but this effect started from the onset of the experiment and cannot be related to the water deficit treatment. As for the D:AF treatment, net  $\text{CO}_2$  assimilation was not significantly modified by the combined treatment (D: $\text{O}_3$ ), except at the end of the treatment when it decreased in Robusta.

Stomatal conductance to water vapour ( $g_w$ ) was severely impacted by stress conditions (Figure 32). Under  $\text{O}_3$ , it decreased with a different behaviour according to the genotypes. In Carpaccio, it decreased from day 9 to reach 50% of the initial value at the end of the experiment (17 days of  $\text{O}_3$  exposure). In Robusta, it decreased from the beginning of  $\text{O}_3$  fumigation.  $g_w$  was also drastically impacted by water deficit in both genotypes, and the effect started earlier than in the  $\text{O}_3$  treatment (Figure 32). In combined conditions, the tendency was the same as under water deficit alone, and  $g_w$  decreased by 50% in the D:AF and D: $\text{O}_3$  treated saplings after 17 days of treatment in both genotypes. The differences in  $g_w$  obtained throughout the experiment explained the difference in  $\text{POD}_0$  levels between the two genotypes and between treatments (Figure 33). In the well-watered condition,  $\text{POD}_0$  was higher in Carpaccio leaves than in Robusta leaves. In response to water deficit and as a consequence of stomatal closure,  $\text{POD}_0$  decreased in both genotypes, with higher values in Carpaccio than in Robusta. Consequently, for the subsequent data analysis we considered that the leaf  $\text{O}_3$  flux levels inside the leaf differed between genotypes for a given sampling date, and this was a key factor to compare the responses of the two genotypes.

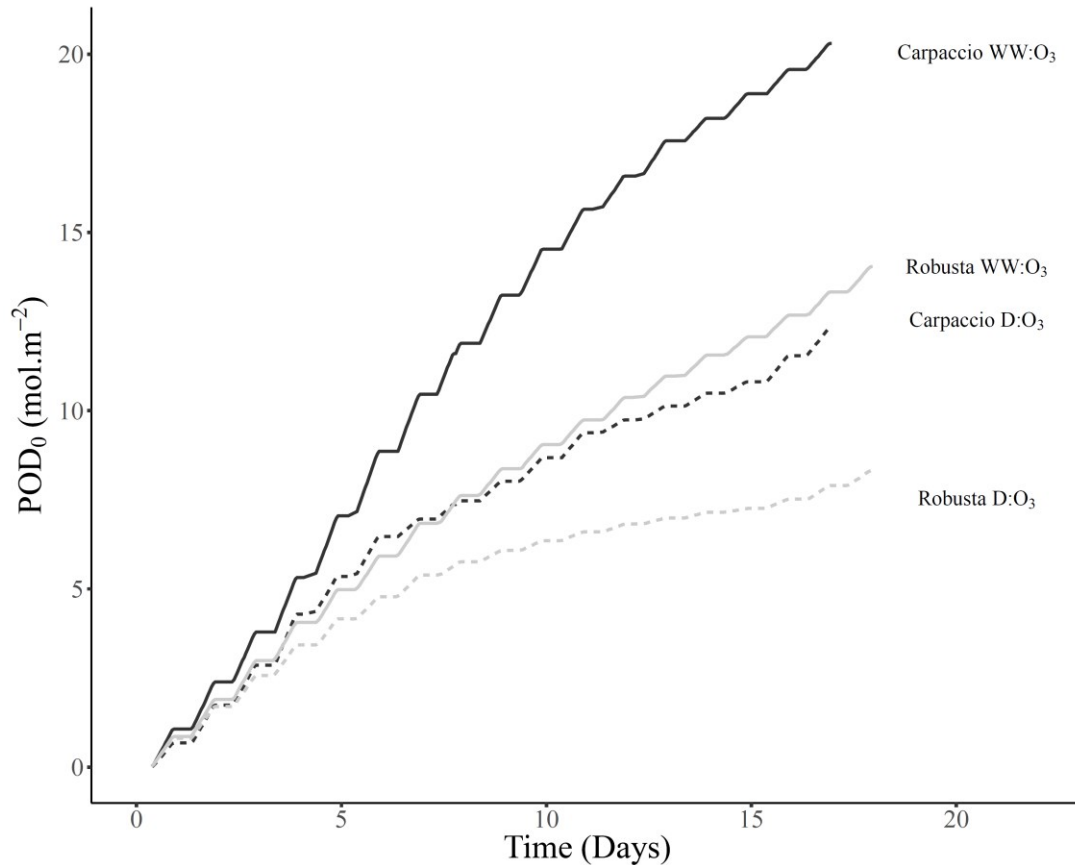


Figure 33 : Evolution of the Phytotoxic Ozone Dose (POD<sub>0</sub>) in the Carpaccio and Robusta genotypes under different water status over the 17 days of O<sub>3</sub> exposure. Carpaccio, black lines; Robusta, grey lines; WW, solid line; D, dashed line. WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

In summary, O<sub>3</sub> treatment impacted A and g<sub>w</sub> in both genotypes. Under water deficit conditions, g<sub>w</sub> decreased more drastically, without any significant effect on CO<sub>2</sub> assimilation by either genotype. In these conditions, we can conclude that other parameters than a lower g<sub>w</sub> explain the decreased CO<sub>2</sub> assimilation under O<sub>3</sub> treatments. In combined conditions, alleviated-O<sub>3</sub> conditions (lower POD<sub>0</sub> values as compared to the O<sub>3</sub> treatment) may explain a lower effect on CO<sub>2</sub> assimilation as compared to the O<sub>3</sub> treatment alone.

#### IV.2.3.3. Antioxidant responses – Ascorbate-glutathione cycle

##### IV.2.3.3.a. Ascorbate and glutathione contents

To assess changes in leaf antioxidant capacity, we analysed total ascorbate and glutathione contents on days (d) 2, 11, and 17 after the onset of the stress factor(s) (Figure 34). At the beginning of the sampling period, total ascorbate contents in control conditions were 8.5 and 7.3 μmol.g<sup>-1</sup> FW in Carpaccio and Robusta, respectively. There was a significant time effect in both genotypes. Whatever the treatments, total ascorbate decreased slightly under all treatments from d 2 to d 17 in Carpaccio. By contrast, the total ascorbate content increased in Robusta over

time, particularly on d 11. There was a slight interaction of time and water deficit in both genotypes, with an increase of total ascorbate on d 11. Over time and under the treatments, the percentage of reduced forms, i.e. the redox ratio, remained relatively stable around 85 % in Carpaccio. In Robusta, the percentage of reduced ascorbate also globally remained stable around 90 % between treatments and over time, except on d 17 under the D:O<sub>3</sub> condition, with higher oxidised levels as compared to the control conditions (70% of reduced form).

The glutathione content presented different dynamic patterns depending on the treatments (Figure 34). Under O<sub>3</sub> conditions (WW:O<sub>3</sub>), it clearly increased, and the effect was more pronounced in Carpaccio than in Robusta. In Carpaccio, the increase reached 1.6 times and 2 times the WW:AF content on d 11 and d 17, respectively, while in Robusta it was 1.7 times and 1.2 times, respectively. In these conditions, the percentage of reduced glutathione remained around 50-60 % in the two genotypes. Under water deficit treatment, the glutathione content remained unmodified in both genotypes. However, this treatment resulted in a lower redox ratio on d 11 and d 17 in Robusta. Finally, in combined conditions (D:O<sub>3</sub>, significant interaction,  $p < 0,01$ ), the stimulatory effect of O<sub>3</sub> on the total glutathione content was still effective but to a lesser extent, particularly in Robusta, in which the glutathione content finally decreased on d 17.

From another perspective, the results from plants exposed to O<sub>3</sub> (WW:O<sub>3</sub> and D:O<sub>3</sub>) could be related to POD<sub>0</sub> (Figure 35). The total AsA content was not significantly correlated with POD<sub>0</sub> (Figure 35A), while a positive correlation was found between the glutathione content and POD<sub>0</sub> in Carpaccio (Figure 35B). In Robusta, the relationship was weakened by the lower glutathione content in WW:O<sub>3</sub> and D:O<sub>3</sub> conditions at higher POD<sub>0</sub> values.



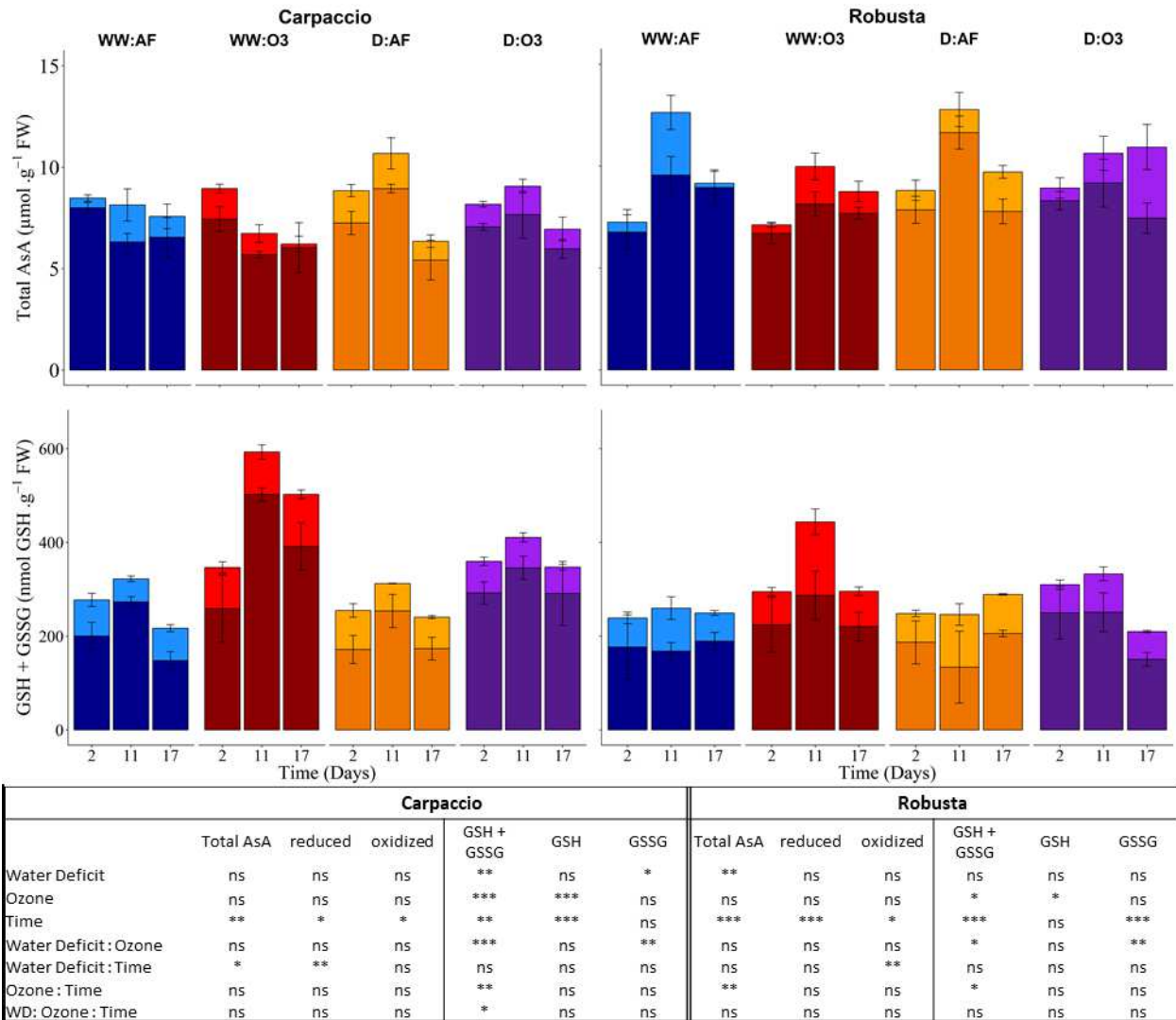


Figure 34 : Impact of ozone or/and water deficit on ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) contents. Total, reduced, and oxidised contents were measured in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes at different treatment times (2, 11, and 17 days). The upper part of the histogram (light colour) represents the oxidised form of the metabolite, and the lower part (dark colour) the reduced form. Means  $\pm$  se, n=4. AF: air-filtered; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone. Asterisks show the significance of factors/interaction: '\*\*\*'  $P \leq 0.001$ , '\*\*'  $P \leq 0.01$ , '\*'  $P \leq 0.05$ .

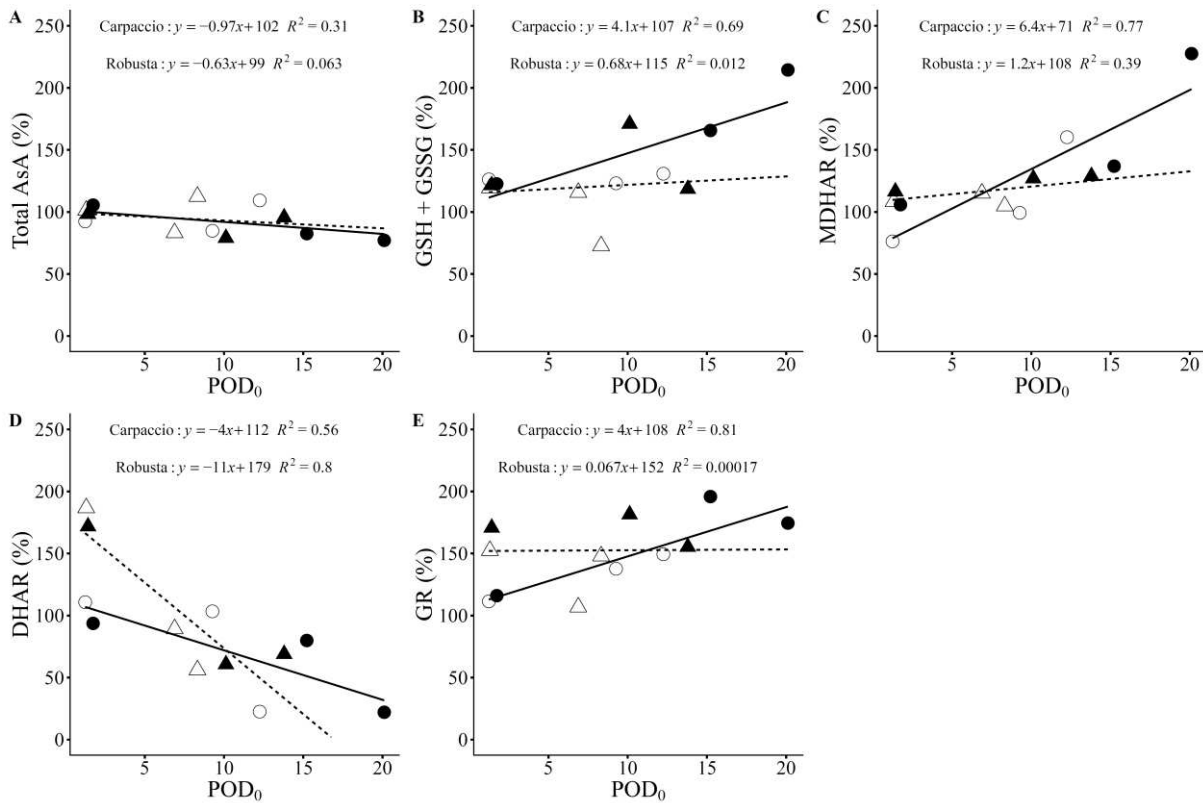


Figure 35 : Expression of ascorbate (A) and glutathione (B) contents, MDHAR (C), DHAR (D), and GR (E) activities relatively to the Phytotoxic Ozone Dose (POD<sub>0</sub>). All parameters are presented in percentages relative to the control treatment. Carpaccio, circles and full lines; Robusta, triangles and dotted lines; well-watered, full shapes; water deficit, empty shapes.

#### IV.2.3.3.b. MDHAR, DHAR, and GR activity and gene expression

The activity of the three most important enzymes of the ascorbate-glutathione cycle was investigated at the different time points, i.e. on days 2, 11, and 17 (Figure 36). Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) regenerates ascorbate from monodehydroascorbate (MDHA) with NAD(P)H as an electron donor. Dehydroascorbate reductase (DHAR) regenerates the reduced form of ascorbate (AsA) from dehydroascorbate (DHA), with glutathione as an electron donor. Finally, glutathione reductase (GR) regenerates the reduced form of glutathione (GSH) from oxidised glutathione (GSSG), with NADPH as an electron donor.

Under the ozone condition (WW:O<sub>3</sub>), the patterns of the detoxification enzymes were quite similar in both genotypes. MDHAR activity increased over time, whereas DHAR activity decreased (Figure 36), concomitantly with a slight down-regulation of *DHAR* genes (Figure 37). *DHAR1* and *DHAR2* expression was down-regulated 2-fold, on d 17 in Robusta and from d 11 in Carpaccio. Similarly to MDHAR activity, GR activity was stimulated under O<sub>3</sub> (Figure 36). *GRI.1* and *GRI.2* expression was up-regulated on d 17 in Carpaccio, whereas up-regulation

was earlier in Robusta, i.e. on d 2 for *GRI.2* and on d 11 for *GRI.1*. By contrast, *GR2* expression was down-regulated from d 11 in Carpaccio, while it remained unmodified in Robusta. O<sub>3</sub> stress played an important role in these results. Regarding the POD<sub>0</sub> relationship, the response of the two genotypes differed slightly. The MDHAR activity increase was correlated with the POD<sub>0</sub> increase, with a stronger relation for Carpaccio ( $R^2 = 0.77$ ). The DHAR activity decrease was correlated to the POD<sub>0</sub> increase (Figure 35D) with a stronger relation for Robusta ( $R^2 = 0.8$ ). For this genotype, it is important to note that DHAR activity was 70% higher than in the WW:AF treatment for the low POD<sub>0</sub> value corresponding to d2. In Carpaccio, the GR activity increase was quite well correlated with POD<sub>0</sub>, whereas it appeared constant in Robusta, with values around 50% higher than in WW:AF saplings.

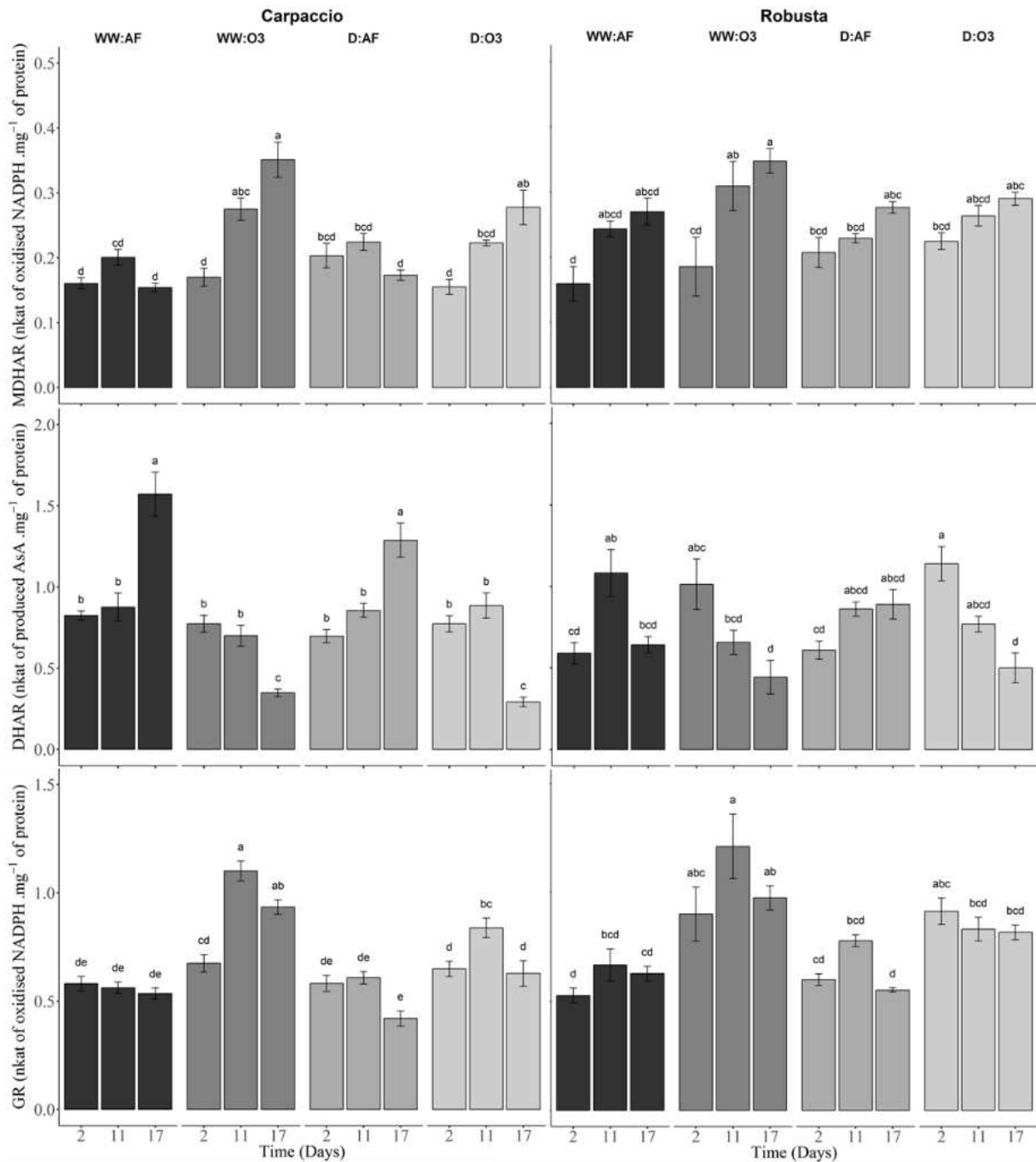


Figure 36 : Impact of ozone or/and water deficit on MDHAR, DHAR, and GR activities. Activities were measured in Carpaccio and Robusta poplar leaves at different treatment times (2, 11, and 17 days). Means  $\pm$  se, n=4. Treatments from black to light grey: well-watered and air-filtered (WW:AF), well-watered and ozone (WW:O3), water deficit and air-filtered (D:AF), water deficit and ozone (D:O3). Identical letters indicate non significantly different mean values, and the alphabetical order corresponds to decreasing values.

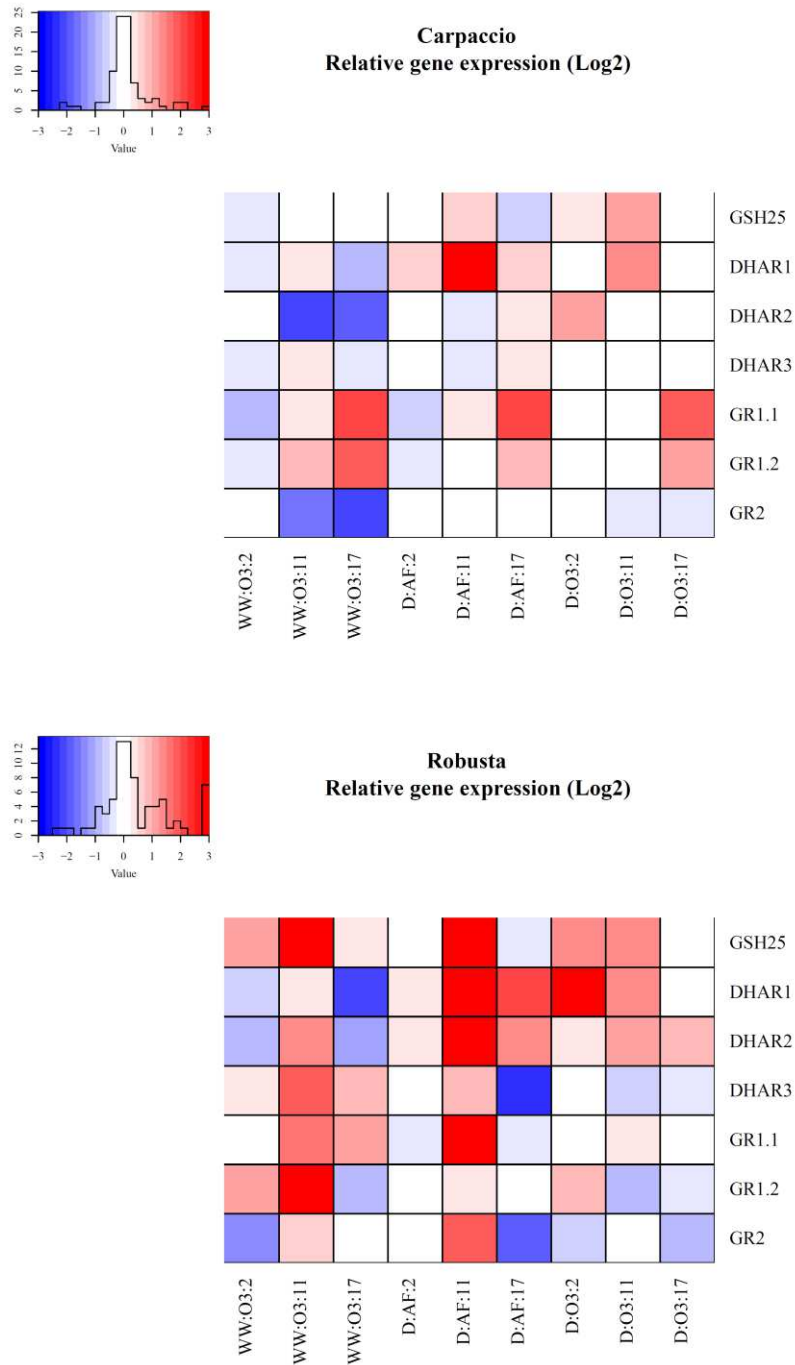


Figure 37 : Ozone- or/and water deficit- driven regulation of gene expression for genes encoding the enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle. The differential transcript accumulation in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes at different treatment times (2, 11, and 17 days) is given as a heatmap. The colour scale depicts transcriptional regulation (upregulation in red and downregulation in blue). Gene expression was normalised to the control treatment WW:AF for each time point of each genotype; a log 2 correction was applied. Means, n=4. AF: air-filtered; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Water deficit did not significantly modify the profile of enzyme activities, and the variations observed over time also occurred in controlled conditions (WW:AF) (Figure 36). As regards gene expression, the two genotypes differed (Figure 37). *DHAR1* and *DHAR2* expression was up-regulated around 3-fold in Robusta on day 11, whereas *DHAR2* expression remained unchanged in Carpaccio, even if *DHAR1* expression was enhanced at that time point. By contrast, *DHAR3* was 2-fold down-regulated on 17 d in Robusta, whereas once again hardly any changes occurred in Carpaccio. *GR* expression also markedly differed between the two genotypes. In Robusta, *GRI.1* and *GR2* expression was strongly up-regulated on d 11, while in Carpaccio the up-regulation of *GRI.1* was delayed until day 17 and no effect was found on *GR2*.

Under the combined treatment (D:O<sub>3</sub>), MDHAR and GR activity profiles were quite similar to the ones observed in WW:O<sub>3</sub> conditions for both genotypes. However, GR activity reached an intermediary level between the WW:O<sub>3</sub> and WW:AF conditions. The same observation was made on gene expression profiling: fold changes were lower than under O<sub>3</sub> or water deficit applied separately. In Robusta, the expression of the three *GR* isoforms was not significantly modified. By contrast, in Carpaccio, *GRI.1* and *GRI.2* were up-regulated on d 17. Concerning *DHAR* genes, *DHAR3* expression was not affected by D:O<sub>3</sub> conditions in either genotype. In Carpaccio, *DHAR1* and *DHAR2* expression were less induced under D:O<sub>3</sub>, than under O<sub>3</sub> alone. The same trend was observed in Robusta, except for the early induction of *DHAR1* on d 2. Finally, we studied the expression of *GSH25*, a key actor in glutathione biosynthesis, in all conditions. *GSH25* expression was up-regulated on d 11 under the WW:O<sub>3</sub> and D:AF and slightly up-regulated under the D:O<sub>3</sub> treatment in Robusta.

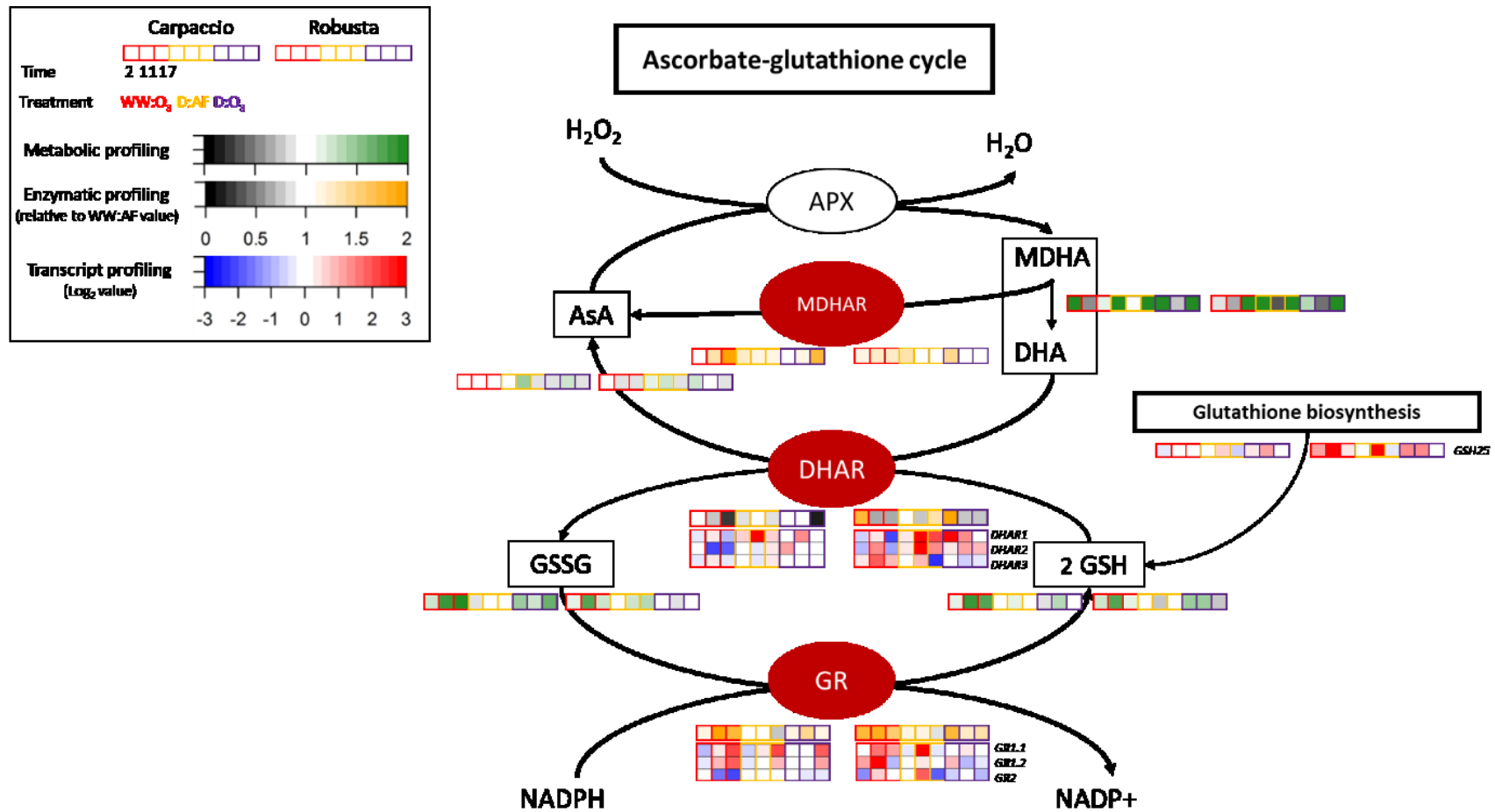


Figure 38 : Integrated analysis of the impact of ozone or/and water deficit on the ascorbate-glutathione cycle. The ozone- or/and water deficit-induced changes in transcript abundance, enzyme activities, reduced /oxidised metabolite contents are shown in colour-coded heat maps. For ascorbate, glutathione, and enzymatic assays, the data at each time point for each condition were normalised to the control, which was set to 1 in each case. Detailed quantitative results are shown in Figure 35 Figure 36. Transcript profiles were retrieved from Figure 37.

We summarised all the enzyme activity and gene expression results in an integrated analysis of the impact of water deficit or/and O<sub>3</sub> on the ascorbate-glutathione cycle (Figure 38). The AsA content was not impacted by O<sub>3</sub> in either genotype, and only the oxidised form slightly increased. The enhancement of glutathione biosynthesis may explain an increase in GSH and GSSG contents. In parallel, DHAR activity decreased when GR and MDHAR activity increased. These changes in enzyme activities were coupled with modifications of gene expression that differed according to the isoforms. Under water deficit, even if there was no significant modification of enzyme activities, genes coding for isoforms of DHAR and GR were regulated, and this result was less pronounced under the combined treatment.

#### **IV.2.4. Discussion**

##### ***IV.2.4.1. Two genotypes with one ozone response each?***

The Carpaccio genotype was previously characterised as ozone- (WW:O<sub>3</sub>-) tolerant, while Robusta was characterised as ozone-sensitive (Dghim et al., 2013). More precisely, the two genotypes exhibited different necrosis development rates on the older leaves and different leaf fall rates under O<sub>3</sub> exposure. Robusta exhibited larger necrotic injuries and a greater leaf loss than Carpaccio for a similar O<sub>3</sub> flux through the leaves (POD<sub>0</sub>) (Dghim et al., 2013). In our experiment, POD<sub>0</sub> evolved differently in a genotype-dependent manner: Carpaccio reached a higher value at the end of the experiment (17 days), explained by differences in stomatal opening between the two genotypes. Robusta closed its stomata earlier than Carpaccio. This response could be an early reaction to O<sub>3</sub> whereas Carpaccio responded more slowly. Thus, Robusta and Carpaccio reacted differently concerning stomatal opening. As regards leaf fall, both genotypes had lost the same percentage of their foliage (around 30%) at the end of the experiment. At that time, photosynthetic assimilation also showed the same O<sub>3</sub> response in both genotypes. However, as Robusta closed its stomata earlier, we can hypothesise that for a higher O<sub>3</sub> influx, Carpaccio alleviated the negative impact of the oxidative stress although it took in more O<sub>3</sub> than Robusta. Could a difference in detoxification processes/strategies explain these different responses?

Carpaccio can display a higher activity of NADP dependent dehydrogenase, higher efficiency in ascorbate and glutathione biosynthesis, and can maintain a more stable NADPH pool under O<sub>3</sub> treatment (Dghim et al., 2013; Dumont et al., 2014b). In our study, we expected these genotypes to also display different patterns of evolution of the antioxidant capacity in leaves in response to O<sub>3</sub> (Figure 38). While the pool of total ascorbate was not significantly modified in either genotype, MDHAR activity significantly increased, simultaneously to a decrease in



DHAR activity. A linear but opposite relationship between the activities of these two enzymes and  $POD_0$  clearly emerged. These results argue in favour of the ability of these two genotypes to maintain a relatively high percentage of ascorbate reduction (even on d 17 when DHAR activity was very low) at least increasing MDHAR activity. However, this increase started earlier, i.e. under lower  $POD_0$ , in Robusta than in Carpaccio.

Interestingly, the decrease in DHAR activity was clearly linked to transcriptional modulation in both genotypes, as  $O_3$  significantly repressed *DHAR1* and *DHAR2* expression, whereas *DHAR3* expression was not impacted in Carpaccio and up-regulated in Robusta (Figure 38). Each isoform could play a specific role depending on the type of stress; therefore, they have to be distinguished. Only *DHAR1* and *DHAR2* seemed to be affected in response to  $O_3$ . Could this variation of expression between *DHAR* isoforms be related to their localization? Among the three poplar *DHAR* genes, *DHAR1* (*PopDHAR1*) was identified as a chloroplastic isoform whereas *DHAR2* (*PopDHAR2*) and *DHAR3* (*PopDHAR3*) as cytosolic ones, both in *Populus tomentosa* (Tang & Yang, 2013) and *Populus trichocarpa* (Lallement et al., 2016). Interestingly, in *Arabidopsis thaliana*, in unstressed conditions, almost all of the total DHAR activity can be attributed to only two isoforms, i.e. one of the cytosolic isoforms (AtDHAR1, homologous to PopDHAR3) and the chloroplastic isoform (AtDHAR3, homologous to PopDHAR1) (Rahantaniaina et al., 2017a). In our work,  $O_3$  affected DHAR activity in all cell compartments. It is noteworthy that in some cases DHAR activity could contribute to glutathione oxidation even if decreases. In *Arabidopsis*, DHAR2 can contribute to glutathione oxidation *in vivo* even though the associated DHAR activity appears to be negligible (Rahantaniaina et al., 2017a). Therefore, these authors suggested that DHA was not the only physiological acceptor substrate for *Arabidopsis* DHAR2-dependent oxidation of GSH.

Based on our results, the increase in MDHAR activity in response to  $O_3$  could indicate greater regeneration of ascorbate from MDHA, avoiding DHA production (Figure 38). Interestingly, an *Arabidopsis* quadruple mutant *cat2dhar1dhar2dhar3*, displaying no DHAR activity and enhanced oxidative stress due to the lack of the catalase function, maintained its ascorbate content and redox state (Rahantaniaina et al., 2017a, 2017b). Consequently, the ability to maintain the redox state was very likely due to other processes, and DHAR was not the key player in that case. As in our work, this could argue for a major role of MDHAR in the preservation of the redox status. Besides, various works have shown the importance of plant MDHAR in stress tolerance (Kavitha et al., 2010; Li et al., 2010; Liu et al., 2012; Sultana et al., 2012). Overexpression of MDHAR in transgenic tobacco notably enhanced tolerance to  $O_3$

(Eltayeb et al., 2007, 2006). In wheat, the differential sensitivity to O<sub>3</sub> was mainly due to its effects on the detoxification ability of catalase and MDHAR (Inada et al., 2012). Still in wheat, the role of a new isoform of MDHAR (TaMDAR6) as a negative regulator of cell death during plant-pathogen interactions was recently demonstrated (Abou-Attia et al., 2016). Interestingly, this isoform could indirectly participate in stomatal regulation (Abou-Attia et al., 2016).

Apart from a putative major role of MDHAR, another possibility to explain our results includes non-enzymatic reduction of DHA by GSH. This could be supported by the increase in total leaf GSH content concomitantly with a slight up-regulation of *GSH25* after 2 and 17 days in Robusta and Carpaccio, respectively. The induction of GSH biosynthesis under O<sub>3</sub> stress was previously observed for both genotypes (Dumont et al., 2014b). In fact, GR activity was also enhanced simultaneously to the increase in GSH content. A linear relation between GR activity and POD<sub>0</sub> values was established, but it was weaker than for DHAR activity. Thus, the increase in total GSH content and the increase in GR activity seem to play an important role under O<sub>3</sub> exposure. Higher GSH contents and *GR* expression levels were also reported in O<sub>3</sub>-tolerant poplar genotypes (Di Baccio et al., 2008). Interestingly, in their work, *GR* isoforms showed distinct patterns of induction in response to O<sub>3</sub> fumigation (60 ppb): the expression of cytosolic *GR* increased more in the tolerant genotype (I214) than in the sensitive one (Eridano), whereas the expression of the chloroplastic *GR* isoform remained the same in both genotypes (Di Baccio et al., 2008). Our results evidence a lag in *GR* gene regulation between the two genotypes and between the *GR* isoforms. In Carpaccio, the genes coding for the cytosolic isoforms (*GRI.1* and *GRI.2*) were upregulated only after 17 days, whereas the chloroplastic isoform (*GR2*) was down-regulated). In Robusta, this effect was earlier, with a maximum in the increase of *GRI.1* and *GRI.2* expression reached after 11 days of O<sub>3</sub> treatment, and a down-regulation of *GR2* expression observed very quickly after 2 days. As in the work of Di Baccio et al. (2008), the cytosolic *GR* isoforms seemed to be the ones responding to O<sub>3</sub> stress. Differential modulation of specific isoforms has already been shown in response to various stresses (Bashir et al., 2007; Yannarelli et al., 2007), while the main part of GR activity in photosynthetic tissues is generally reported to result from the chloroplastic isoform (Di Baccio et al., 2005; Edwards et al., 1990; Gill et al., 2013).

In brief, genotype responses differed. In Robusta, defence was set up early, and greatly related to DHAR and GR activities. The increase in GR activity remained stable, whereas DHAR activity decreased. As for Carpaccio, regarding POD<sub>0</sub> responses there was an increase in MDHAR and GR activity with the ozone flux inside the leaves. According to our detoxification

data (Figure 38), the glutathione metabolism, rather than the ascorbate metabolism, appears as a key process under O<sub>3</sub>-induced oxidative stress.

#### IV.2.4.2. *Two genotypes tolerant to mild water deficit*

There is an important variability of *Populus sp.* in drought sensitivity (Monclus et al., 2006; Street et al., 2006). Drought tolerance can be envisaged from two points of view: i) an isohydric strategy, i.e. stomatal closure, reduction of water consumption and C<sub>i</sub> (for a long-term drought), and higher detoxification efficiency, leading to reduced growth and productivity, or ii) an anisohydric strategy, i.e. when the plants maintain their stomata open, maintaining high rates of photosynthesis and growth with the risk of a lower hydric status (Tardieu & Simonneau, 1998; Yang et al., 2009). In the present case, both Carpaccio and Robusta closed their stomata under mild water deficit without decreasing CO<sub>2</sub> assimilation. As g<sub>w</sub> decreased and CO<sub>2</sub> assimilation stabilised, the water use efficiency (WUE) of both genotypes increased in water deficit conditions. This response could be an argument to classify them as drought-tolerant genotypes, as trees with high WUE and low growth are more tolerant to drought (Monclus et al., 2006; Regier et al., 2009). Finally, both genotypes showed decreased growth (inhibition of growth in height and in diameter, biomass reduction) as compared to the control treatment, arguing for an isohydric strategy. However, foliar biomass decreased more in Carpaccio than in Robusta.

Water deficit treatment alone (D:AF) was assumed to be the lowest oxidative stress inducer in our experimental conditions. Nevertheless, water deficit *per se*, unlike O<sub>3</sub>, affected the ascorbate level, with a slight global increase in total contents while glutathione levels remained unchanged. The ability of both genotypes to maintain a high reduced ascorbate ratio is a clue for their tolerance to drought-induced oxidative stress (Jubany-Mari et al., 2010). In this context, it is quite interesting to underline that drought induced the up-regulation of *DHAR1*, the chloroplastic isoform, in both genotypes after 11 days. This result could be linked to the fact that chloroplasts and peroxisomes were identified as the main sites of ROS production under drought conditions (see Noctor et al., 2014 for a review). The capacities of plants to detoxify ROS in the chloroplasts or in the peroxisomes through other mechanisms could also be linked with enhanced photorespiration (Noctor et al., 2014).

Interestingly, and as previously mentioned in response to ozone, Robusta seemed more reactive to water deficit than Carpaccio. After 11 days of water deficit, *GSH25*, *DHAR1*, *DHAR2*, and *GRI* expression increased in Robusta, whereas hardly any change occurred in gene expression or in enzyme activity in Carpaccio. Moreover, *DHAR3* and *GR2* presented similar expression

patterns in Robusta alone, with a sharp decrease at the end of the water deficit treatment. Despite regulation at the transcriptional level, the glutathione pool and MDHAR, DHAR, and GR activities were not affected by water deficit. However, previous works, notably on trees, reported modifications of the ascorbate and glutathione cycles induced by water deficit. For example, enzyme activities, ascorbate and glutathione contents increased in apple trees after 6 days without watering (Wang et al., 2012), and in *Quercus ilex* submitted to drought in a field experiment (Nogués et al., 2014). In poplar (*P. tremula x alba*), water deficit increased the glutathione content in leaves, leading to better adaptation under mild drought (Samuilov et al., 2016). Transcriptomic analysis of drought-stressed *Populus euphratica* leaves showed an enrichment in genes involved in the ascorbate and glutathione systems (Tang et al., 2013). All these experiments were conducted in the field or the greenhouse, so the plants were exposed to natural light. Thus, relatively to our work, we can propose that our experimental conditions were insufficient to induce an important oxidative stress under water deficit, or maybe there was a highly localised one in the chloroplasts due to electron leakage. Even if our water deficit treatment was well monitored, it was not combined with high light, so that a constitutive defence mechanism or a slight increase of these mechanisms inside the chloroplasts may have been sufficient to handle electron leakage at a relatively low level. We could also suggest that the slight increase in detoxification activity in the chloroplasts, such as the modulation of gene expression, may not have been sufficient to impact the changes in enzyme activity measured at the leaf level.

#### **IV.2.4.3. Synergism, antagonism, or additive effect of combined stresses?**

Concerning the height growth, the combined treatment had the same effect on the sapling as water deficit alone, likely to substantially decrease wood productivity; the combination could be qualified as additive, as O<sub>3</sub> did not reduce vertical growth. The effect on the number of fallen leaves was antagonistic in both genotypes, with an intermediate leaf loss between the WW:O<sub>3</sub> and D:AF treatments. Regarding gas exchanges, the combined treatment also had an antagonistic effect: stomatal closure following the water deficit treatment seemed to reduce the impact of O<sub>3</sub> on CO<sub>2</sub> assimilation, which may have resulted from a lower POD<sub>0</sub> for the combined treatment as compared to O<sub>3</sub> alone, for both genotypes. This lower POD<sub>0</sub> in the combined treatment than with O<sub>3</sub> alone likely resulted in an intermediate oxidative stress between the single effects of water deficit and O<sub>3</sub>. Regardless of the regulation of the ascorbate-glutathione cycle in the D:O<sub>3</sub> conditions, there was also an antagonistic effect for a great part of the parameters under study. We proposed a theoretical model to understand the interaction

of O<sub>3</sub> and water deficit (Figure 39). Two threshold models could be applied in toxicological ozone dose responses: (i) the linear threshold model, which assumes a dose below which there is no treatment effect (Figure 39A) and (ii) the hormesis model, a biphasic dose-response model in which the response at low doses is the opposite of the one occurring at higher dose (Figure 39B) (Agathokleous et al., 2019). This choice was linked to our result regarding POD<sub>0</sub>. For example, the linear threshold might apply to Total AsA without reaching a phytotoxic O<sub>3</sub> dose, and the enhancement of DHAR activity at low dose for Robusta could fit with hormetic model. The antagonistic effect due to the interaction of O<sub>3</sub> and water deficit could be translated into different ways on these models and depends on the parameter considered. Firstly, the combined effect of O<sub>3</sub> and water deficit is a protective one regarding a limitation of the ozone flux inside the leaf through stomatal closure without reaching the toxic threshold. Secondly, the antagonistic effect could imply other defence or repair processes with a modification of the toxically threshold. Both protective effects could be observed simultaneously. These antagonistic effects could also modify the slope and the magnitude of the response in the hormetic model (Figure 39, area in grey). An approach comparing different O<sub>3</sub> doses in interaction with water deficit could allow verifying these assumptions.

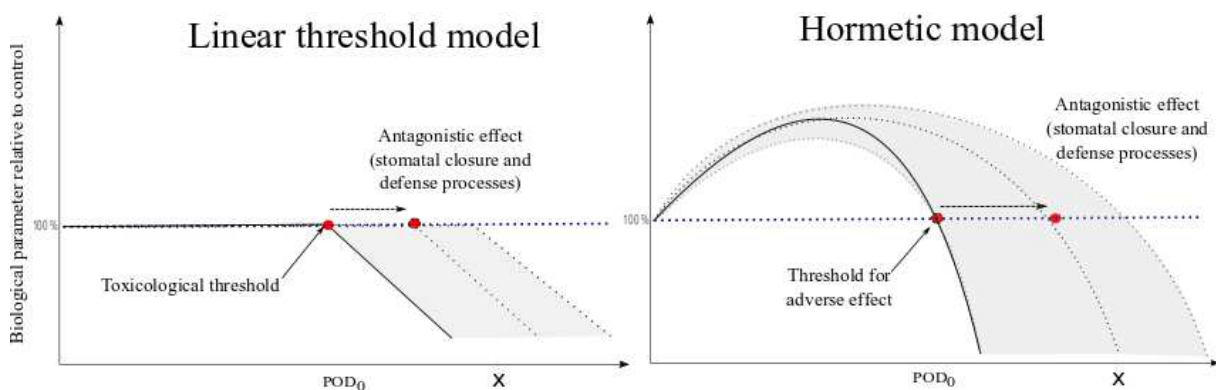


Figure 39 : Theoretical representation of the evolution of biological parameters relative to control with POD<sub>0</sub> as ozone dose. This representation adapted from Agathokleous et al. (2018) compared two ozone dose-response models (continuous line), the linear threshold model (A) versus the biphasic dose response, i.e. hormetic model (B). Possible antagonistic effects induced by water deficit were represented on the ozone responses (grey area). The stomatal closure protective effect does not necessarily modify the ozone responses but in the case of other mechanisms association (defence or repair), toxicological threshold (red point) could be modified resulting in a different response (dotted line and grey area).

In our experimental chamber conditions, the combined treatments globally reduced the impact of O<sub>3</sub> on the leaf detoxification response in both genotypes (antagonistic effect), but, there was an additive effect on growth, with an important decrease of *ca.* 30% of productivity losses due

to water deficit. Pääkkönen et al. (1998) reported that depending of the experimental conditions, the birch clone and the biological parameter considered, the response to drought and O<sub>3</sub> could be independent, additive or interactive (antagonistic/synergistic). They compared the interaction of ozone and water deficit in the chamber experiment (high stress) and open-field experiment (low stress). In the chamber experiment, water deficit stress protected birch saplings from ozone injuries under high-stress conditions. In open-field experiment, enhanced ozone damage was observed in birch under more realistic restricted water supply. This would argue for the idea that depending on stress intensity and duration, the response of one biological parameter could be antagonistic, additive or synergistic. We can add that in ambient natural conditions, light is more intense than in our phytotronic chamber conditions. Combined with O<sub>3</sub> and water deficit, this could lead to a more important oxidative stress, and subsequent significant growth reduction. The addition of all these factors could enhance the sensitivity of trees to other environmental stresses such as pest invasions, heat, wind, etc, and thereby could have a synergistic effect on the plant response. Further investigations are needed to compare responses among a range of POD<sub>0</sub> values in order to decipher if water deficit *per se* has a protective effect through stomatal closure or if there is a synergistic effect because of carbon starvation.

Our results underline that glutathione plays a crucial role, particularly in response to ozone treatment. Depending on the type of stress, isoforms of the Halliwell-Asada-Foyer enzymes were differently modulated, and this regulation may depend on ROS localisation. It is now well-know that ROS can act as crucial players in signalling in response to stress, not only as deleterious actors (Baxter et al., 2013; Mittler, 2017; Noctor et al., 2017; Vaultier & Jolivet, 2015). Thus, differential regulation of the HAF cycle could result from the different signalling pathways triggered in response to these distinct stresses. In *Arabidopsis*, Rahantaniaina et al. (2017a) suggested that DHAR could adjust the intracellular glutathione status in oxidative stress conditions to ensure the appropriate activation of signalling through downstream pathways such as those involving salicylic acid. Still in the context of oxidative stress, *Arabidopsis GRI* plays a crucial role in redox signalling because it regulates the glutathione oxidation state, which is implied in jasmonic acid signalling (Mhamdi et al., 2010). The interactions between enzymes of the HAF cycle and signalling are a particularly exciting perspective that can open up new prospects for future/upcoming research.

### **IV.3. Implication de l'AsA et du GSH en réponse à l'O<sub>3</sub> et/ou la sécheresse chez trois espèces de chênes**

Les travaux de thèse ont permis d'aborder l'effet du stress combiné sous un nouvel angle d'approche. En effet, une collaboration internationale impliquant deux laboratoires italiens, l'Université de Pise et le Centre de Recherche National de Florence, a permis de développer une étude sur un dispositif O<sub>3</sub>-FACE (*Free-air concentration enrichment*). L'étude concernait la réponse de trois espèces de chênes soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou la sécheresse, notre équipe apportant son expertise sur des aspects de détoxification cellulaire. Compte tenu des difficultés pour déterminer l'AsA et le GSH par la méthode spectrophotochimique, adaptée de Queval & Noctor, (2007) et usuellement utilisée, nous avons développé, pour les échantillons de chêne, un dosage de ces métabolites par HPLC. Dans cette partie, le dispositif sera présenté succinctement et les résultats obtenus par notre laboratoire sur l'AsA et le GSH seront approfondis.

L'ensemble des résultats de l'étude ont été publiés dans la revue *Science of total Environment* (cf. annexe) :

Pellegrini E., Hoshika Y., **Dusart N.**, Cotrozzi L., Gérard J., Nali C., Vaultier M.-N., Jolivet Y., Lorenzini G., Paoletti E., 2019, *Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions*

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.413>

#### **IV.3.1. Présentation du dispositif expérimental**

L'expérimentation est mise en place au début de l'automne 2014. Des jeunes plants (2 ans) de *Q. ilex*, *Q. pubescens* et *Q. robur* sont placés dans un dispositif O<sub>3</sub>-FACE (Figure 40) à Sesto Fiorentino, Florence, Italie (43°48'59"N, 11°12'01"E, 55 m a.s.l.). Les jeunes plants sont plantés dans des pots de 10 L contenant un mélange tourbe:sable:sol de pépinière (1:1:1, v/v/v) et maintenus à capacité au champ jusqu'au début de l'expérimentation. Les plants vont pousser sous combinaison de 3 niveaux d'O<sub>3</sub> (1.0, 1.2 et 1.4 fois la concentration ambiante, notés : AA, 1.2 × AA et 1.4 × AA, respectivement) et 3 niveaux d'irrigation du sol (100, 80 et 42 % de la capacité au champ moyenne, notés : WW (well watered), MD (moderate drought) et SD (severe drought), respectivement), du 1<sup>er</sup> juin au 15 octobre 2015 (4.5 mois). Le dispositif de mesure est décrit dans l'article de Paoletti et al. (2017) et les niveaux d'exposition à l'ozone dans Hoshika et al. (2018). Chaque traitement O<sub>3</sub> est divisé en 3 plots, lesquels sont composés de 9 arbres chacun (3 arbres par traitement sécheresse). À la fin de l'expérimentation, la première

feuille mature du flush de l'année est prélevée et un pool de feuilles des 3 plants par plot pour chaque traitement ( $O_3 \times$  déficit hydrique) est congelé à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

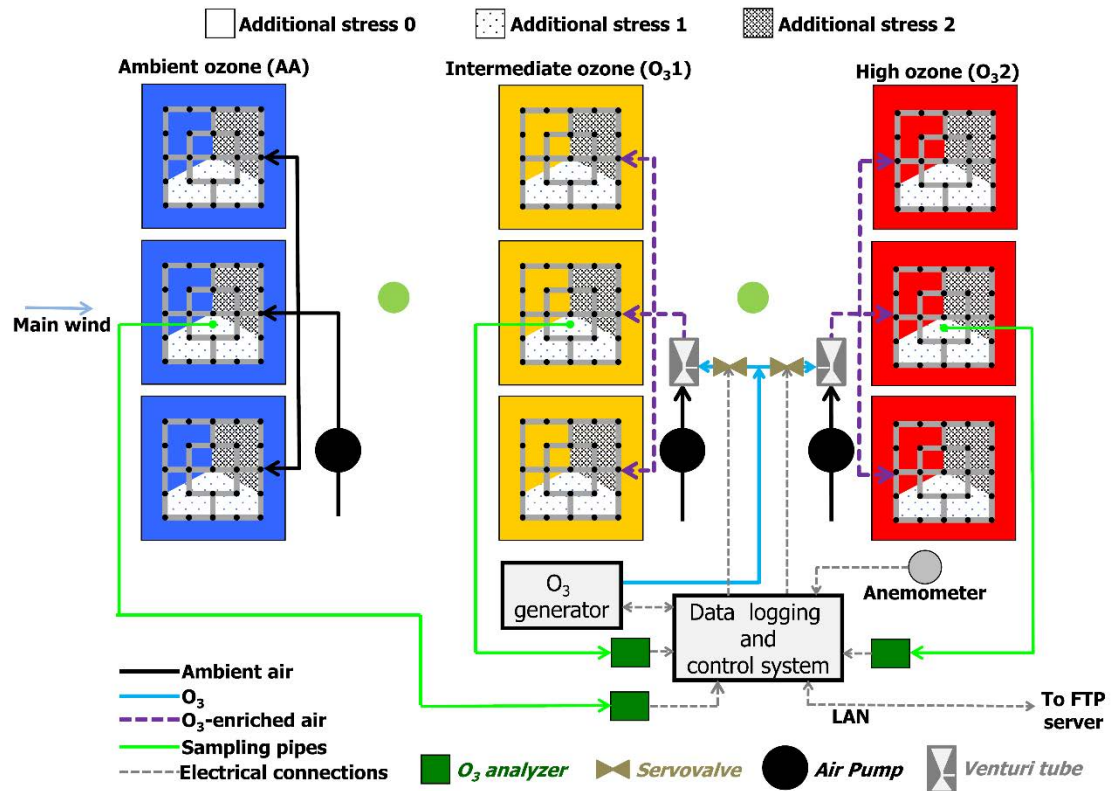


Figure 40 : Schéma du dispositif O<sub>3</sub>-FACE (Florence, Italie) issu de Paoletti et al. (2017). Sur fond bleu, le traitement O<sub>3</sub> ambiant (AA) ; sur fond jaune, le traitement  $1.2 \times$  AA ; et sur fond rouge, le traitement  $1.4 \times$  AA. L'intensité du traitement sécheresse (Additional stress) est indiquée par un motif différent (dégradé de pointillés).



### IV.3.2. Évolution du cycle ascorbate-glutathion chez le chêne en combinaison de stress

Les niveaux constitutifs en AsA présentent des variations interspécifiques : les moyennes (calculées sur l'ensemble des traitements) par espèce sont de 17.65, 13.99 et 10.99  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  DW respectivement pour *Q. robur*, *Q. ilex* et *Q. pubescens* (ANOVA à 1 facteur avec l'effet de l'espèce en facteur :  $P \leq 0.001$ ). L'ANOVA à 3 facteurs révèle un effet significatif à la fois de l' $\text{O}_3$  et de l'espèce sur l'AsA total (Tableau 7). Comparé au traitement AA, le traitement 1.2 x AA augmente légèrement le contenu en AsA pour les 3 espèces, tandis que le traitement 1.4 x AA semble impacter négativement le contenu en AsA total. Pour *Q. ilex*, il y a une diminution de 23 % et cet effet est moins prononcé pour *Q. pubescens* et *Q. robur* (respectivement - 12 % et - 7.5 %, Figure 41). Le traitement déficit hydrique en condition AA semble impacter négativement *Q. robur*, avec une diminution du contenu en ascorbate de 20.1, 18.1, 14.7  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW pour WW, MD et SD respectivement. En condition combinée, l'effet de l' $\text{O}_3$  (1.4 x AA) est parfois amplifié par le déficit hydrique du sol pour les deux espèces décidues (*Q. pubescens* et *Q. robur*). Pour *Q. pubescens*, le contenu en AsA diminue de 28 % en MD:1.4 x AA comparé à MD:AA, et pour *Q. robur*, la diminution est de 35 % sous SD:1.4 x AA par rapport à SD:AA. Pour les espèces décidues, le pourcentage de réduction est stable, autour de 90 %, et cela, quel que soit le traitement. Pour le chêne vert (*Q. ilex*), le taux de réduction est plus faible en condition WW avec 72 %, 61 % et 62 % d'AsA réduit pour AA, 1.2 x AA et 1.4 x AA respectivement. Cette diminution est atténuée en condition de sécheresse.

Tableau 7 : Significativité de l'ANOVA à 3 facteurs de l'effet de l' $\text{O}_3$ , de la sécheresse (drought) et de l'espèce de chêne (plant species) : l'ascorbate total (Tot AsA), ascorbate réduit (AsA), oxydé (DHA.MDHA), le glutathion total (Tot GSH), réduit (GSH) et oxydé (GSSG). Les astérisques montrent la significativité : \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , ns  $p > 0.05$ .

Effects	d.f.	AsA total	AsA	DHA.MDHA	GSH Tot	GSH	GSSG
<b>O<sub>3</sub></b>	2	**	ns	***	ns	ns	ns
<b>Water availability</b>	2	ns	ns	**	ns	ns	ns
<b>Plant species</b>	2	***	**	***	ns	ns	**
<b>O<sub>3</sub> × water availability</b>	4	*	ns	***	ns	ns	ns
<b>O<sub>3</sub> × plant species</b>	4	ns	ns	ns	*	*	ns
<b>Water availability × plant species</b>	4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>O<sub>3</sub> × water availability × plant species</b>	8	*	ns	*	ns	ns	ns

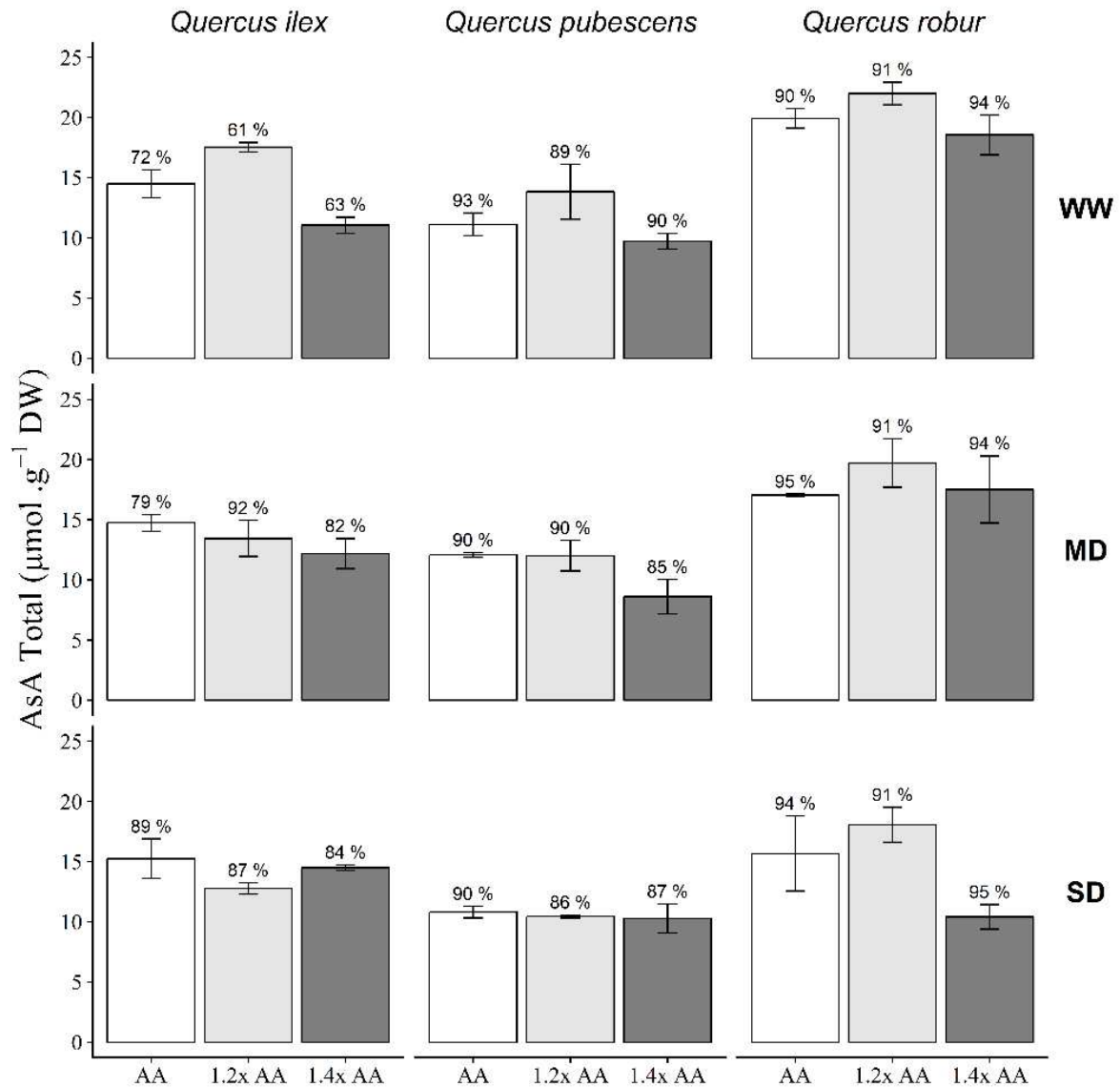


Figure 41: Quantification du contenu en ascorbate total en  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche (DW) dans les feuilles de *Quercus ilex*, *Q. pubescens* et *Q. robur* exposées à l' $\text{O}_3$  (air ambiant (AA),  $1.2 \times \text{O}_3$  ambiant,  $1.2 \times \text{AA}$  et  $1.4 \times \text{AA}$ ) et soumises à différents régimes hydriques (well-watered (WW), moderate drought (MD) et severe drought (SD)). (n = 3) moyenne  $\pm$  erreur standard. Les pourcentages correspondent au niveau de réduction.

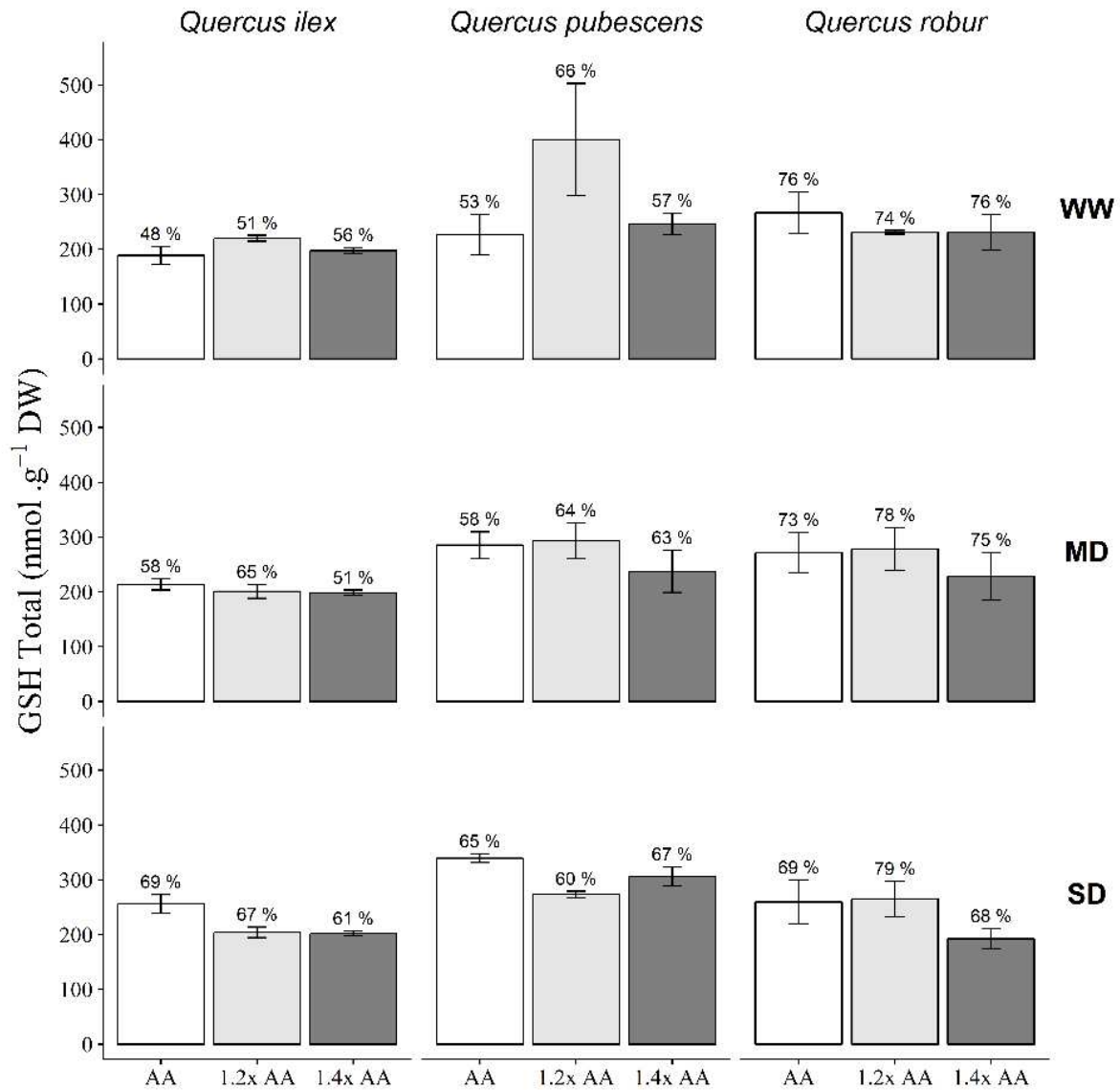


Figure 42: Quantification du contenu total en glutathion (GSH) exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière sèche (DW) dans les feuilles de *Quercus ilex*, *Q. pubescens* et *Q. robur* exposées à l'O<sub>3</sub> (air ambiant (AA),  $1.2 \times \text{O}_3$  ambiant et  $1.4 \times \text{O}_3$  ambiant  $1.2 \times \text{AA}$  et  $1.4 \times \text{AA}$ ) et soumises à différents régimes hydriques (well-watered (WW), moderate drought (MD) et severe drought (SD)). (n = 3) moyenne  $\pm$  erreur standard. Les pourcentages correspondent au niveau de réduction.

Pour le GSH total, un effet espèce est également observé, avec des moyennes (calculées sur l'ensemble des traitements) correspondant à 290, 247 et 209 nmoles.g<sup>-1</sup> DW, respectivement pour *Q. pubescens*, *Q. robur* et *Q. ilex*. D'après les résultats d'ANOVA à trois facteurs, l'O<sub>3</sub> et le déficit hydrique semblent avoir peu d'impact sur le glutathion (Tableau 7). Des différences de statut redox apparaissent cependant. En condition d'irrigation contrôle (WW), *Q. robur* présente le pourcentage de réduction le plus élevé (environ 75 %), tandis que le taux est d'environ 50 % pour *Q. pubescens* et *Q. ilex* (Figure 42). Néanmoins, les différents traitements O<sub>3</sub> modifient faiblement les taux de réduction chez les 3 espèces. Pour le chêne vert et le chêne pubescent, le pourcentage de GSH augmente avec l'intensité de la sécheresse.

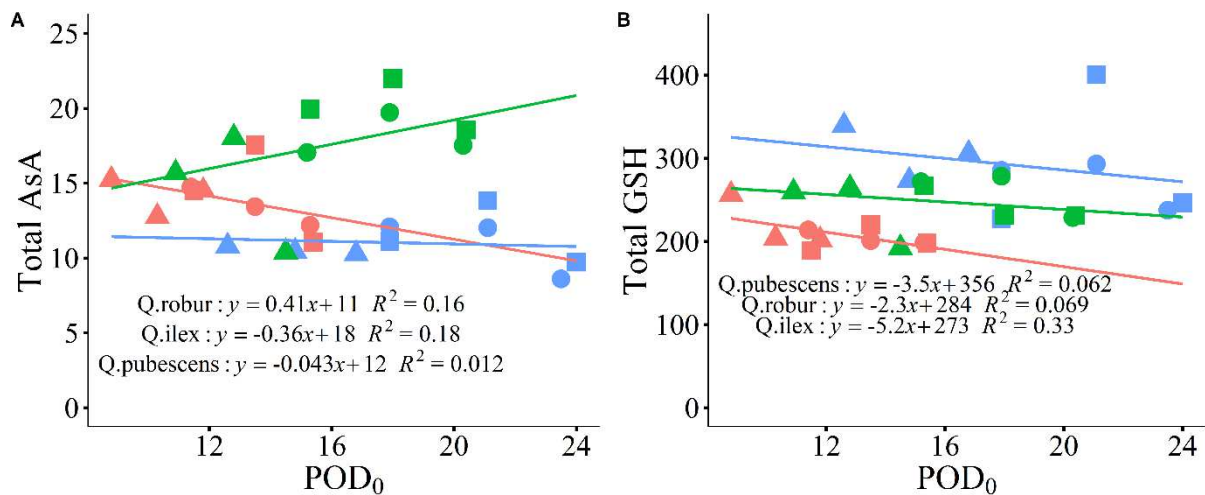


Figure 43 : Contenus totaux en (A) ascorbate et (B) glutathion, exprimés en fonction de l'indice Phytotoxique ozone dose above a treshold of 0 nmol.mm<sup>-2</sup> (POD<sub>0</sub>) pour *Q. ilex* (rouge), *Q. robur* (vert) et *Q. pubescent* (bleu). La forme correspond au régime hydrique : triangle, well-watered (WW); rond, moderate drought (MD) et carré, severe drought (SD).

En relation au POD<sub>0</sub>, le flux d'O<sub>3</sub> entrant, le profil diffère selon l'espèce de chêne (Figure 43, A et B). Le contenu en ascorbate total de *Q. ilex* diminue avec l'augmentation du POD<sub>0</sub>, alors qu'il est plutôt stable pour *Q. pubescent* et augmente pour *Q. robur*. Cependant, pour les trois espèces, la relation semble ne pas être linéaire. En effet, à partir d'un POD<sub>0</sub> d'environ 14 mol.m<sup>-2</sup> pour *Q. Ilex*, 17 mol.m<sup>-2</sup> pour *Q. Robur* et 22 mol.m<sup>-2</sup> pour *Q. pubescent*, un « décrochage » est observé. Pour le glutathion en relation au POD (Figure 43, B), la différence constitutive entre les 3 espèces reste bien visible. Pour chacune d'entre elles, le contenu en glutathion tend à diminuer avec l'augmentation du POD.

### IV.3.3. Résumé/discussion

Les chênes décidus (*Q. pubescens* et *Q. robur*) sont normalement considérés comme moins résistants à l'ozone comparés aux espèces à feuillage persistant (Calatayud et al., 2011). Dans le dispositif O<sub>3</sub>-Face mis en place en Italie, l'évolution de la biomasse de *Q. ilex* et *Q. pubescent* en fonction du POD<sub>y</sub> est similaire (Hoshika et al., 2018). *Q. robur*, quant à lui, est plus sensible, avec une perte de biomasse plus marquée et des dégâts foliaires plus importants (données non publiées). L'exposition à l'O<sub>3</sub> et/ou au traitement sécheresse induisent une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) chez les 3 espèces (déterminée par la méthode amplex red, Pellegrini et al., 2019). Cette augmentation est atténuée en combinaison avec le traitement sécheresse sévère. Néanmoins, des différences importantes en termes de concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont observées entre les espèces décidues et persistantes. En effet, c'est pour *Q. ilex* que les concentrations les plus faibles sont notées. Pour les trois espèces, les deux contraintes augmentent le contenu total en caroténoïdes, alors qu'en parallèle, les flavonoïdes totaux diminuent. Les niveaux de phénols totaux de *Q. ilex* et *Q. pubescent*, quant à eux, ne varient pas. Pour les 3 espèces, la défense antioxydante est donc en place et semble être maintenue. Par ailleurs, il convient toutefois de noter que les niveaux élevés de concentration d'O<sub>3</sub> et la sécheresse sévère induisent un réarrangement partiel de la voie des phénylpropanoïdes chez *Q. robur*. Sur la base de ces résultats, les phénols totaux ainsi que l'AsA et GSH totaux ne sont pas suffisants pour expliquer des différences de degré de tolérance entre les trois espèces. En effet, *Q. robur* est l'espèce la moins tolérante (sur la base de l'évolution de la croissance et des symptômes) malgré des niveaux d'antioxydants supérieurs aux deux autres. L'explication est peut-être à chercher du côté de la réponse des stomates, première barrière de défense à l'ozone et au déficit hydrique. Ainsi, *Q. ilex*, qui semble être le moins impacté par l'O<sub>3</sub>, sûrement grâce à la fermeture des stomates, présente un POD<sub>0</sub> plus faible au terme des 4.5 mois d'exposition à l'O<sub>3</sub>. Cela laisse à penser que la stratégie d'évitement mise en place par *Q. ilex* permet à l'arbre de ne pas être dépassé par le stress oxydant. Pour conclure, il est apparu que, sur la plupart des traits biochimiques étudiés, la combinaison des traitement O<sub>3</sub> et sécheresse ont un effet antagoniste (diminution du flux d'ozone entrant par la sécheresse).

#### **IV.4. Régulation et signalisation phytohormonales du génotype Robusta**

Dans les parties précédentes, nous nous sommes principalement intéressés à caractériser quelques traits de la détoxification foliaire mise en place en réponse à l'ozone et/ou à la sécheresse. Afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes permettant la mise en place de la réponse aux stress chez les arbres, notamment les mécanismes de régulation de la détoxification, la signalisation hormonale a également été étudiée en réponse aux deux contraintes.

Pour cette étude, notre choix s'est porté sur le cultivar Robusta (*P. deltoides* x *P. nigra*). En effet, nous avons vu précédemment (cf. section IV.2.3.3) que Robusta présente une régulation plus précoce des gènes du cycle HAF en réponse à l'O<sub>3</sub> et à la sécheresse. Nous avons donc émis l'hypothèse que les acteurs de signalisation seraient plus sensibles chez ce génotype. En réalité, peu de travaux existent sur la réponse hormonale des arbres (peuplier, hêtre et chêne) à l'O<sub>3</sub>. Les quelques expérimentations réalisées avaient pour cadre une exposition à des concentrations élevées d'O<sub>3</sub> (200-300 ppb) et des temps de prélèvement à l'échelle de la journée (Koch et al., 1998; Landi et al., 2019; Vahala, 2003a). Notre étude, privilégiant une exposition chronique à 120ppb/jour et des temps de prélèvement plus courts, avait pour but de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les éléments de la signalisation hormonale induits lors de la réponse aux stress ozone et/ou sécheresse ? Plus particulièrement, quelles sont les variations des niveaux d'hormones et de l'expression des gènes codant pour les protéines de cette signalisation ?
- Quelle est la dynamique de cette signalisation hormonale lorsque les deux stress sont appliqués séparément ?
- Quel est l'effet de la combinaison de contraintes sur cette dynamique ?

Là encore, l'originalité de ce travail repose sur l'étude de deux contraintes, O<sub>3</sub> et déficit hydrique du sol, seules ou combinées. Pour la première fois, le profil de la dynamique d'acteurs de la signalisation hormonale sera établi chez le peuplier pour chacune de ces contraintes appliquées séparément et pour la combinaison des deux.

Réalisée en 2016, l'expérimentation mise en place pour cette partie est présentée dans la section II.1.4 du Matériels et Méthodes. Pour rappel, les boutures de Robusta ont été placées dans les mêmes conditions que celles de l'expérience 1, présentée dans ce chapitre (cf II.1.3), avec les mêmes traitements (O<sub>3</sub>, sécheresse et la combinaison des deux). Plusieurs paramètres liés aux conditions de stress O<sub>3</sub> et sécheresse sont présentés dans le Tableau 8. La 10<sup>e</sup> feuille en partant

de l'apex a été marquée au début du traitement. Afin d'étudier la dynamique de réponse hormonale, des prélèvements ont été réalisés à quatre temps : jour 1, 2, 4 et 11. Le 1<sup>er</sup> jour, les prélèvements ont été effectués après 10 h de fumigation. Pour les jours 2, 4 et 11, ils ont eu lieu au milieu de la photopériode (7h de lumière), après 6 h de fumigation.

Tableau 8 : Indicateurs des conditions de culture du génotype Robusta soumis à l'O<sub>3</sub> et à la sécheresse. Exposition moyenne à l'O<sub>3</sub> représentée par deux indicateurs, le SUM00 (sum of hourly O<sub>3</sub> concentrations) et l'AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb), à la fin de la période de fumigation. Les conditions d'humidité du sol sont représentées par le REW moyen calculé sur l'ensemble de l'expérimentation (calibration sonde TDR/poids). La valeur de "water used" prend en compte la somme cumulée de l'eau ajoutée à chaque plante au cours de l'expérimentation (n=16). FA: filtered air; WW: well-watered; D: water deficit; O<sub>3</sub>: ozone. Le potentiel hydrique de base ( $\psi_{\text{base}}$ ) a été déterminé le dernier jour de fumigation à l'aide d'une chambre à pression de Scholander.

Water treatment	Ozone treatment	SUM00 (ppm.h <sup>-1</sup> )	AOT40 (ppm.h <sup>-1</sup> )	REW moyen (%)	Water used (L)	$\psi_{\text{base}}$ (MPa)
WW	FA	0.734	0	85.6 ± 9.3	4.65	-0.40 ± 0.07
	O <sub>3</sub>	14.82	9.06	85.4 ± 9.5	4.51	-0.36 ± 0.08
D	FA	0.734	0	45.8 ± 8.8	3.70	-0.68 ± 0.12
	O <sub>3</sub>	14.82	9.06	45.5 ± 8.0	3.33	-0.62 ± 0.09

## IV.4.1. Résultats

### IV.4.1.1. Paramètres de croissance

Durant les 11 jours d'expérimentation, l'O<sub>3</sub> et le déficit hydrique n'ont pas impacté de manière significative la croissance en hauteur des jeunes arbres (Tableau 9). Néanmoins, la hauteur des plants soumis au déficit hydrique tend à être inférieure à celle du traitement WW (- 6 %). La croissance radiale est diminuée par le déficit hydrique (- 10 %) (Tableau 9). Malgré une chute sous ozone, le nombre de feuilles présentes sur l'arbre ne diffère pas significativement entre les traitements. La masse sèche des feuilles est, par contre, significativement diminuée par la sécheresse (Tableau 9). L'interaction des facteurs O<sub>3</sub> et déficit hydrique n'est cependant pas significative sur l'ensemble des paramètres de croissance (Tableau 9).

Tableau 9 : Impacts de l'O<sub>3</sub> et du déficit hydrique sur les paramètres de croissance du génotype Robusta. Moyenne ± se, n= 16. La significativité statistique des facteurs ou de l'interaction est en gras ( $P \leq 0.05$ ). FA: filtered air; WW: well-watered; D: water deficit; O<sub>3</sub>: ozone.

Water treatment	Ozone treatment	Hauteur (cm)		Diamètre (mm)		Nombre de feuilles		MS feuille (g)		MS tige (g)	
WW	FA	70.72	±1.44	8.48	±0.17	32.88	±0.71	16.18	±0.89	6.05	±0.34
	O <sub>3</sub>	72.69	±1.11	8.48	±0.15	27.56	±0.54	15.83	±0.49	6.78	±0.26
D	FA	67.44	±1.19	7.76	±0.12	31.62	±0.63	13.87	±0.5	5.71	±0.21
	O <sub>3</sub>	67.12	±1.02	7.77	±0.11	28.5	±0.51	13.39	±0.47	5.62	±0.19
D		0.058		<b>&lt;.001</b>		0.463		<b>0.009</b>		0.355	
O <sub>3</sub>		0.25		0.97		0.843		0.688		<b>0.049</b>	
D x O <sub>3</sub>		0.346		0.968		0.58		0.917		0.113	



#### IV.4.1.2. Pigments photosynthétiques et détermination du peroxyde d'hydrogène

Au cours de l'expérimentation et pour les conditions en air filtré, les teneurs en chlorophylles augmentent (de 30 à 40 CCI) alors que les teneurs en anthocyanes diminuent (de 0.09 à 0.03 ACI, Figure 44) en 14 jours. Pour les plants soumis à l'O<sub>3</sub> (WW:O<sub>3</sub> et D:O<sub>3</sub>), l'augmentation des teneurs en chlorophylles se stabilise à partir du quatrième jour autour de 35 CCI (Figure 44, A). Pour les anthocyanes, l'effet de l'O<sub>3</sub> (WW:O<sub>3</sub> et D:O<sub>3</sub>) se traduit par une augmentation des teneurs après le quatrième jour pour finalement diminuer en fin d'expérimentation, sans toutefois atteindre le niveau des plants placés sous air filtré (WW:FA et D:FA) (Figure 44, B).

Au cours de l'expérimentation, l'apparition de précipités bruns sur les disques foliaires, caractéristique du peroxyde d'hydrogène, permet d'identifier la présence de ce ROS dès 2 jours pour les arbres exposés à l'O<sub>3</sub> (WW:O<sub>3</sub> et D:O<sub>3</sub>, Figure 45). Pour le traitement D:FA, la coloration semble révéler la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> le 11<sup>e</sup> jour.

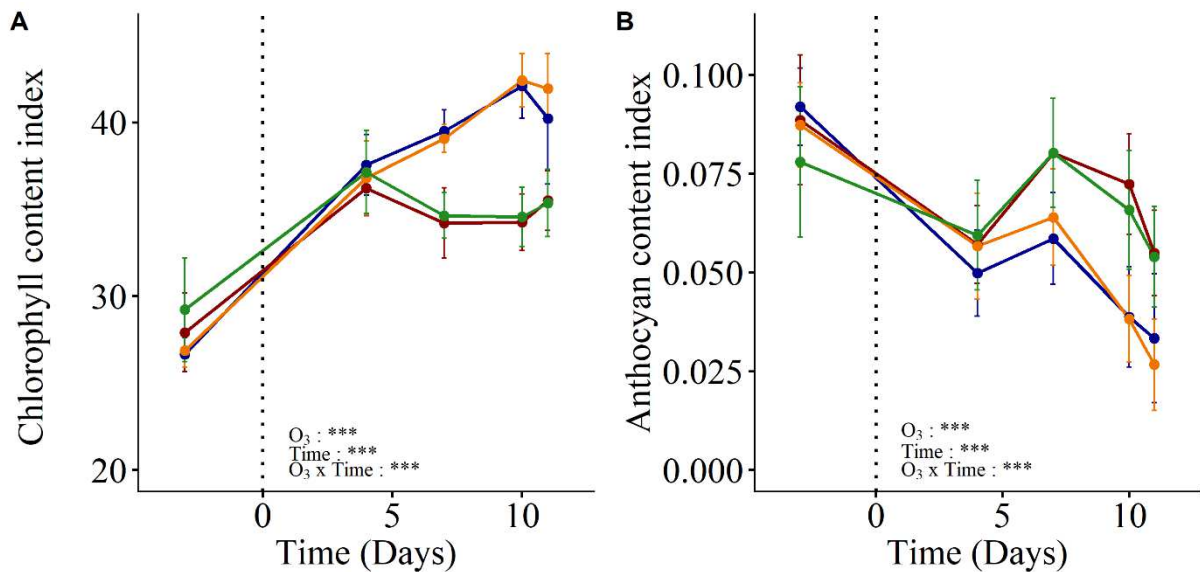


Figure 44 : Cinétique de réponse de la teneur en chlorophylles (A) et en anthocyanes (B) chez Robusta, soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. Moyenne ± se, n= 4. La significativité statistique des facteurs ou de l'interaction est indiquée (\*\*\*,  $P \leq 0.05$ ). WW:FA (contrôle) : bleu ; D:FA (déficit hydrique et air filtré) : jaune ; WW:O<sub>3</sub> (bien hydraté et ozone) : rouge ; D:O<sub>3</sub> (déficit hydrique et ozone) : vert. La ligne pointillée au temps 0 marque le début de la fumigation.

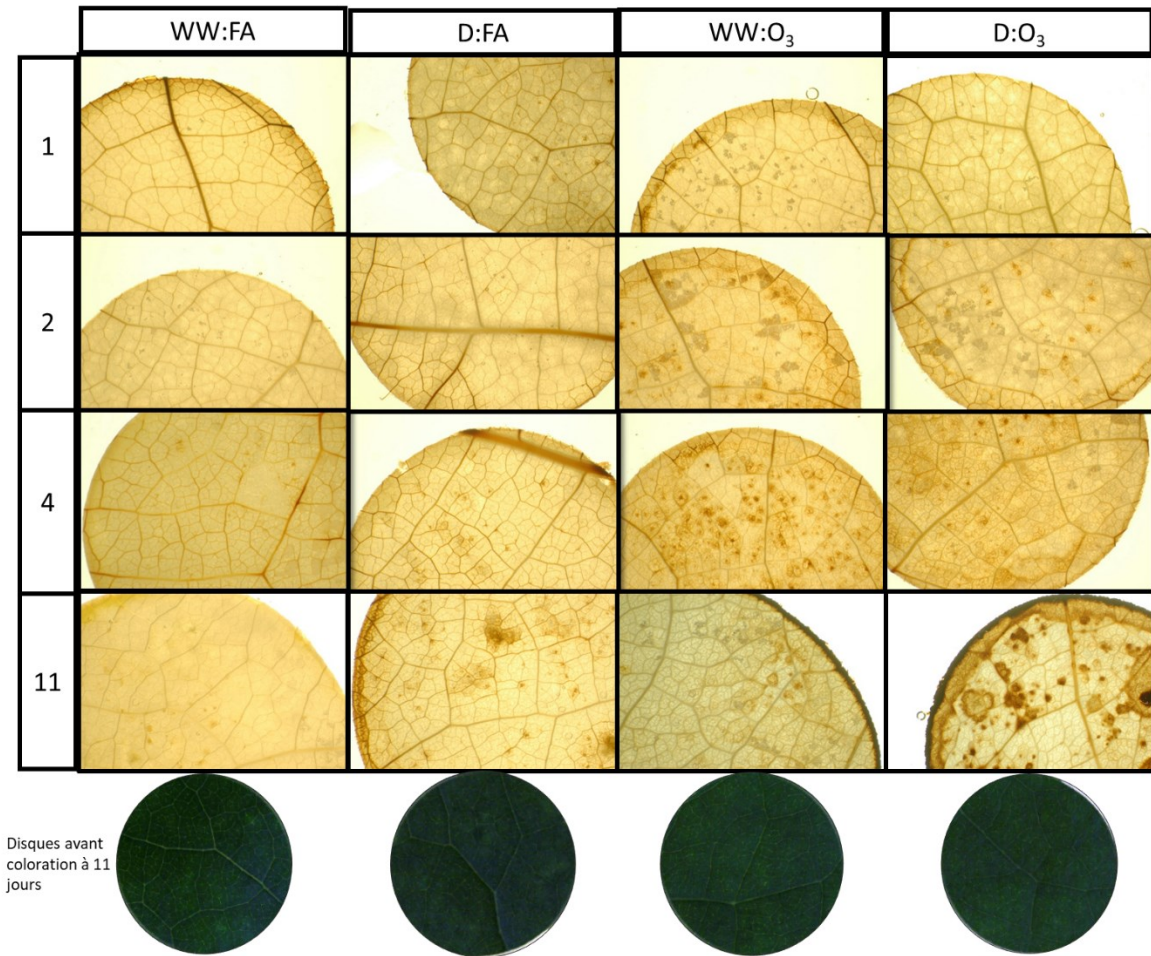


Figure 45: Cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la technique de coloration au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) pour les arbres soumis aux traitements O<sub>3</sub> et/ou déficit hydrique à 1, 2, 4 et 11 jours de traitement. Le DAB oxydé par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forme des précipités marrons. WW:FA : bien hydraté et air filtré (contrôle) ; D:FA : déficit hydrique et air filtré ; WW:O<sub>3</sub> : bien hydraté et ozone ; D:O<sub>3</sub> : déficit hydrique et ozone.

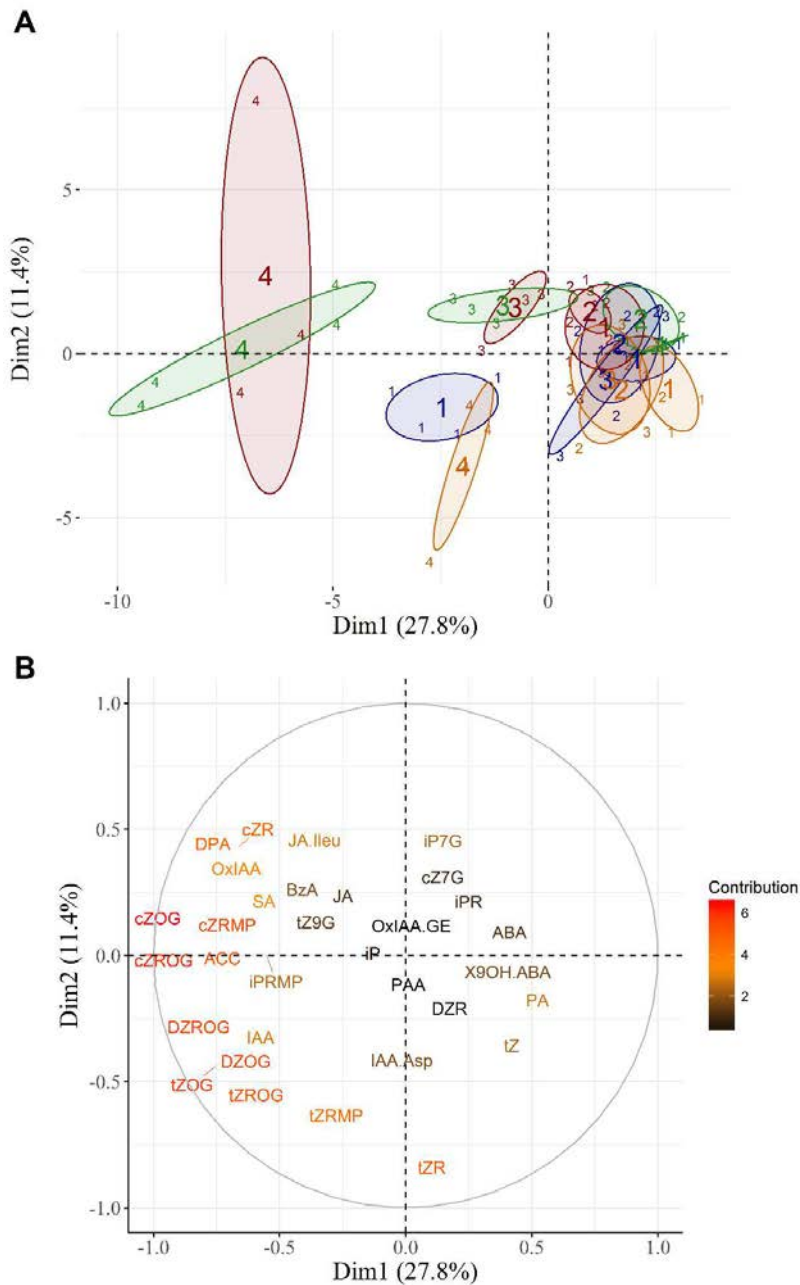


Figure 46 : Analyse en composantes principales de la distribution des échantillons (A) en fonction de la corrélation de 32 phytohormones (B) sur un plan factoriel à deux dimensions. Les phytohormones ont été déterminées pour le génotype Robusta lors de 4 dates, 1, 2, 4 et 11 jours, représentées respectivement par les chiffres 1, 2, 3 et 4. Les ellipses (intervalles de confiance 95 %) correspondent aux différentes combinaisons de traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Les abréviations utilisées pour les différentes hormones sont présentées dans le Tableau 11. Les deux axes ont été testés par une ANOVA à 3 facteurs et les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

#### IV.4.1.3. Profilage hormonal

Le plan principal de l'ACP (Dim.1 x Dim.2) explique 39,2 % de la variabilité observée (Figure 46). 27,8 % de cette variabilité sont attribués à la Dim.1 et révèlent un fort effet temps et O<sub>3</sub> présent sur cet axe (Tableau 10). L'axe deux (Dim. 2), quant à lui, répond à l'O<sub>3</sub> et au déficit hydrique, mais pas à leur interaction, et représente 11.4 % de la variabilité (Tableau 10). Ainsi, les cytokinines (CKs) semblent répondre de manière importante au stress O<sub>3</sub>. Un groupe de formes 'cis' est fortement corrélé à la Dim.1, tandis que les formes 'trans' sont plutôt corrélées à l'axe 2. Les formes o-glucoside des 'trans' et dihydro-CKs sont, elles, corrélées aux 2 dimensions. Un groupe lié à l'acide abscissique et formé de l'ABA, de l'acide phaséique (PA) et du 9-hydroxy-ABA (9OH-ABA) est également corrélé à la Dim.1 et, malgré une faible contribution globale, semble important sur les temps « courts » (1 et 2 jours). L'ACC et l'acide salicylique ont, par contre, une contribution modérée, de même que le couple IAA/OxIAA. Les 2 formes sont cependant inversement proportionnelles sur l'axe 2. Pour le reste des hormones, telles que les JAs, le BzA, les IPs, etc., la contribution au plan factoriel principal est faible.

Les sous-parties suivantes traiteront donc les phytohormones qui contribuent majoritairement à l'ACP. Elles seront étudiées par famille (ABAs, IAAs, etc.) en réponse à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique.

Tableau 10 : Résultats de l'ANOVA à 3 facteurs incluant le déficit hydrique (WD), la fumigation à l'ozone (O<sub>3</sub>) et le temps (Time) sur les deux dimensions de l'analyse en composantes principales (Dim.1 et Dim.2). La significativité statistique des facteurs ou de l'interaction est en gras ( $P \leq 0.05$ ).

		Dim.1	Dim.2
	Df	Pvalue	Pvalue
Water Deficit	1	0.133	<b>0.024</b>
O <sub>3</sub>	1	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
Time	3	<b>&lt;0.001</b>	0.228
WD x O <sub>3</sub>	1	0.901	0.719
WD x Time	3	0.338	0.326
O <sub>3</sub> x Time	3	<b>&lt;0.001</b>	0.095
WD x O <sub>3</sub> x Time	3	0.436	0.896

Tableau 11 : Noms et abréviations des phytohormones détectées lors du profilage hormonal. Les fractions A et B correspondent respectivement aux fractions acide et basique.

<b>Fraction A</b>				<b>Fraction B</b>			
	Abreviation	Formule	MW		Abreviation	Formule	MW
<b><u>Auxins</u></b>				<b><u>Cytokinins</u></b>			
indole-3-acetic acid	IAA	C10H9N1O2	175.19	trans-zeatin	tZ	C10H13N5O1	219.25
IAA-aspartate	IAA-Asp	C14H14N2O5	290.28	trans-zeatin riboside	tZR	C15H21N5O5	351.37
oxo-IAA	OxIAA	C10H9N1O3	191.19	trans-zeatin-9-glucoside	tZ9G	C16H23N5O6	381.39
oxo-IAA-glucose ester	OxIAA-GE	C16H19N1O6	353.33	trans-zeatin-O-glucoside	tZOG	C16H23N5O6	381.39
Phenylacetic acid	PAA	C8H8O2	136.15	trans-zeatin riboside -O-glucoside	tZROG	C21H31N5O10	513.51
				trans-zeatin riboside monophosphate	tZRMP	C15H22N5O8P1	431.34
				cis-zeatin riboside	cZR	C15H21N5O5	351.37
<b><u>Abscisic acid</u></b>				<b><u>Cis-zeatin-O-glucoside</u></b>			
abscisic acid	ABA	C15H20O4	264.32	cis-zeatin-7-glucoside	cZ7G	C16H23N5O6	381.39
phaseic acid	PA	C15H20O5	280.31	cis-zeatin-O-glucoside	cZOG	C16H23N5O6	381.39
dihydrophaseic acid	DPA	C15H22O5	282.3	cis-zeatin riboside -O-glucoside	cZROG	C21H31N5O10	513.51
9-hydroxy-ABA	9OH-ABA	C15H20O5	280.32	cis-zeatin riboside monophosphate	cZRMP	C15H22N5O8P1	431.34
				dihydrozeatin riboside	DZR	C15H23N5O5	353.38
<b><u>Salicylic acid</u></b>				<b><u>dihydrozeatin-O-glucoside</u></b>			
	SA	C7H6O3	138.12	dihydrozeatin riboside -O-glucoside	DZOG	C16H25N5O6	383.41
				dihydrozeatin riboside -O-glucoside	DZROG	C21H33N5O10	515.52
<b><u>Benzoic acid</u></b>				<b><u>isopentenyl adenine</u></b>			
	BzA	C7H6O2	122.12	isopentenyl adenine	iP	C10H13N5	203.25
				isopentenyl adenosine	iPR	C15H21N5O4	335.37
<b><u>Jasmonates</u></b>				<b><u>isopentenyl adenine-7-glucoside</u></b>			
Jasmonic acid	JA	C12H18O3	210.28	isopentenyl adenine-7-glucoside	iP7G	C16H23N5O5	365.39
JA-isoleucine	JA-ILE	C18H29N1O4	323.44	isopentenyl adenosine monophosphate	iPRMP	C15H22N5O7P1	415.3
				<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid</b>	ACC	C4H7N1O2	101.1

IV.4.1.3.a. L'ABA impliqué sur les temps courts

En condition contrôle (WW:FA), les contenus en forme active de l'acide abscissique (Figure 47, A) et en acide dihydrophaséique (DP ; Figure 47, B) sont relativement stables au cours du temps. Le contenu foliaire en forme active de l'ABA est modifié par le déficit hydrique (seul ou combiné). En effet, les concentrations d'ABA, d'acide phaséique (PA) et de 9-OH ABA sont deux fois supérieures à celles observées au début du traitement contrôle (Figure 47, A). Pour le traitement combiné (D:O<sub>3</sub>), le contenu en ABA actif reste plus élevé le deuxième jour par rapport à celui observé pour le traitement déficit hydrique seul (Figure 47, A). De son côté, l'O<sub>3</sub> tend à diminuer la teneur en ABA de manière non significative, mais augmente celle du DPA le 11<sup>e</sup> jour. En effet, pour les deux traitements ozone (WW:O<sub>3</sub> et D:O<sub>3</sub>), les teneurs en DPA restent inférieures à 250 pmol.g<sup>-1</sup> MS les 3 premiers temps de mesure, puis atteignent 610 pmol.g<sup>-1</sup> MS le 11<sup>e</sup> jour.

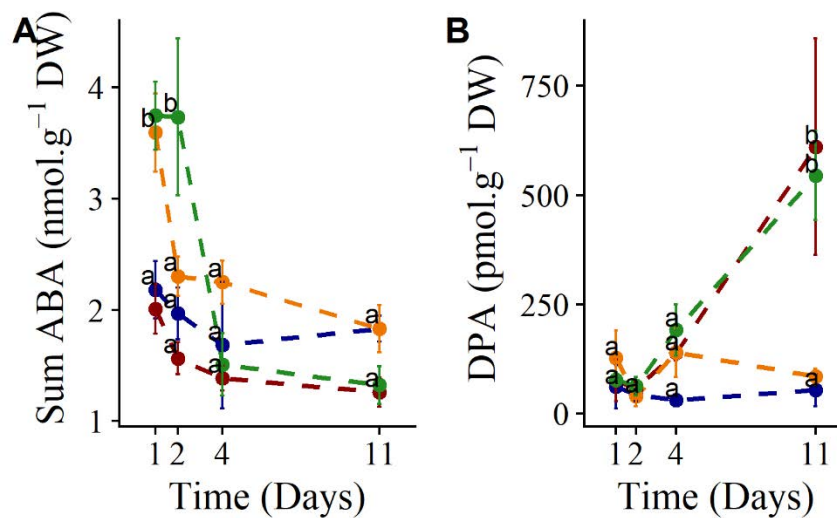


Figure 47 : Evolution des teneurs en acide abscissique (ABA) et en acide dihydrophaséique dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. (A) La somme des teneurs en ABA, correspondant à la somme de l'acide abscissique (ABA), de l'acide phaséique (PA) et du 9-hydroxy-ABA (9OH-ABA), et (B) la teneur en dihydrophaséique acide (DPA) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres différentes représentent les différences significatives à chaque temps. Si les moyennes se chevauchent, une seule lettre est représentée.

IV.4.1.3.b. Auxines : le couple acide indole-3-acétique (IAA) et OxIAA

Lorsque les feuilles sont exposées à un traitement AF (D:AF ou WW:AF), les teneurs en IAA et OxIAA restent stables au cours du temps (pas d'effet significatif, Figure 48, A et B). Le ratio OxIAA/IAA est alors égal à 1 (Figure 48, C). Sous traitements O<sub>3</sub> (WW:O<sub>3</sub> et D:O<sub>3</sub>), une augmentation en IAA et OxIAA est observée au cours du temps (Figure 48, A et B). A 11 jours de traitement, la teneur en OxIAA est supérieure d'environ 100 pmol.g<sup>-1</sup>DW par rapport à celle de l'IAA, ce qui résulte d'un doublement du ratio IAA/Ox-IAA. L'acide phénylacétique, qui appartient lui aussi au groupe des auxines, contribue faiblement à la variabilité des données (Figure 46) et aucun effet des traitements n'est observé sur sa teneur (données non montrées). Quant à l'IAA-aspartate, sa teneur foliaire est augmentée par le déficit hydrique à 11 jours (donnée non montrée).

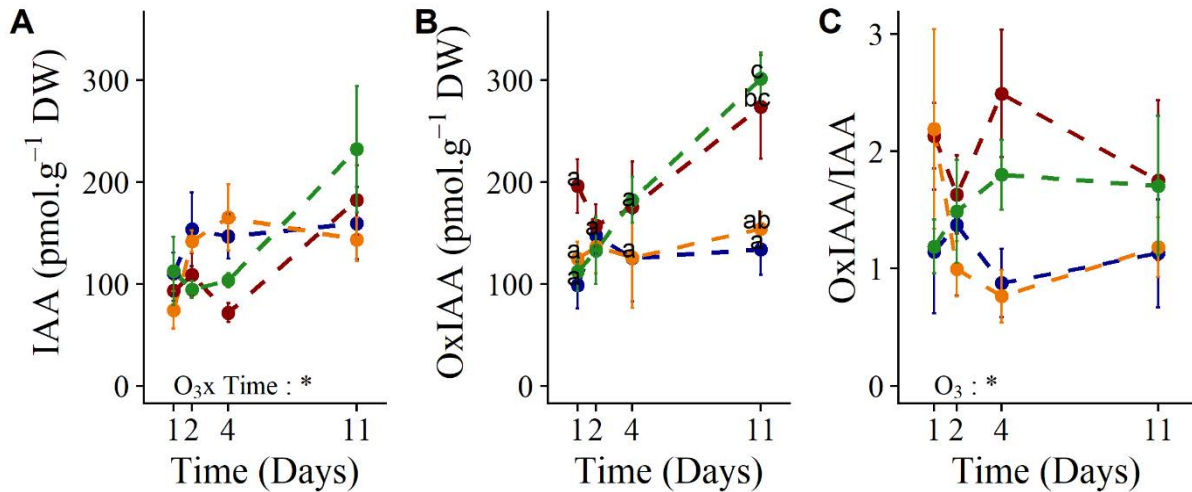


Figure 48 : Evolution des teneurs en IAA et OxIAA dans les feuilles de Robusta, soumises à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. Les teneurs en IAA (A) et OxIAA (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres différentes représentent les différences significatives à chaque temps. Si les moyennes se chevauchent, une seule lettre est représentée. L'absence de lettre traduit l'absence d'effet significatif des traitements (ANOVA à 3 facteurs).



IV.4.1.3.c. Éthylène, acide salicylique (SA) et acide jasmonique (JA)

La teneur en ACC, précurseur de l'éthylène, augmente au cours du temps pour les 4 traitements. L'augmentation est plus précoce sous O<sub>3</sub>, puisqu'elle apparaît dès 4 jours (Figure 49, A). L'augmentation la moins marquée est observée pour le traitement D:AF. Dans les 3 autres conditions, le seuil de détection de 200 nmol.g<sup>-1</sup> DW du spectromètre de masse a été dépassé à 11 jours, entraînant une possible sous-estimation de la valeur obtenue (Figure 49, A). Un profil relativement similaire est observé pour SA, avec une augmentation moyenne de 4 à 34 nmol.g<sup>-1</sup> DW sur la période de traitement (Figure 49B). L'augmentation est plus précoce pour le traitement contrôle, mais légèrement moins marquée pour le traitement combiné D:O<sub>3</sub> (27 nmol.g<sup>-1</sup> DW à 11 jours). Sous traitement déficit hydrique seul (WW:AF), le niveau de SA est stable et inférieur à 10 nmol.g<sup>-1</sup> DW (Figure 49, B).

Les teneurs en jasmonate et jasmonate-isoleucine ne sont pas significativement modifiées entre les traitements, probablement en raison d'une variabilité biologique très importante (Figure 49, C).

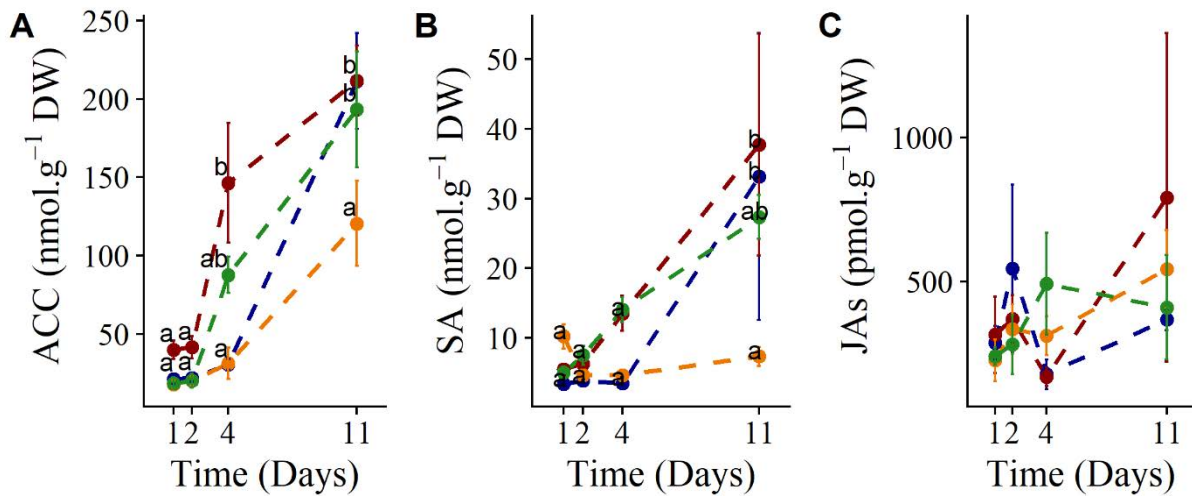


Figure 49 : Evolution des teneurs en ACC, SA et JA dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. Les teneurs en ACC (A), en SA (B) et en JAs (C) (somme des JA et JA-isoleu) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres différentes représentent les différences significatives à chaque temps. Si les moyennes se chevauchent, une seule lettre est représentée. L'absence de lettre traduit l'absence d'effet significatif des traitements (ANOVA à 3 facteurs). Note : le seuil de détection du spectromètre de masse a été dépassé pour les plus fortes valeurs en ACC (11 jours).



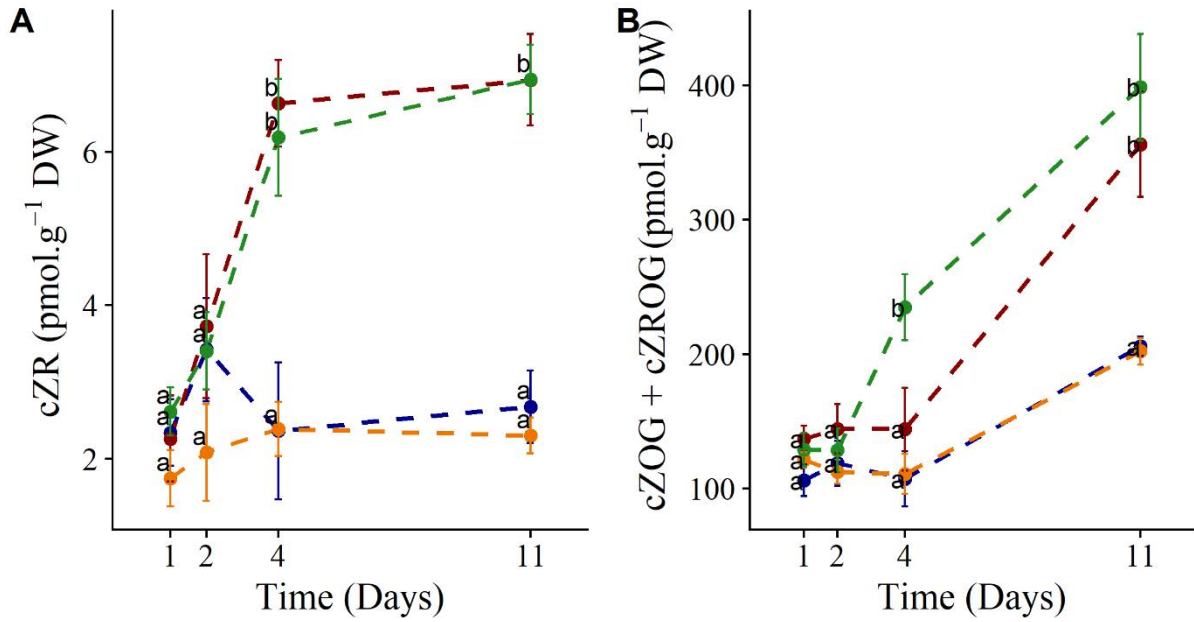


Figure 50 : Evolution des teneurs foliaires en cZR et cZOG+cZROG dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. La teneur en cZR (A) et la somme des teneurs des formes désactivées réversibles (cZOG et cZROG) (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres différentes représentent les différences significatives à chaque temps. Si les moyennes se chevauchent, une seule lettre est représentée.

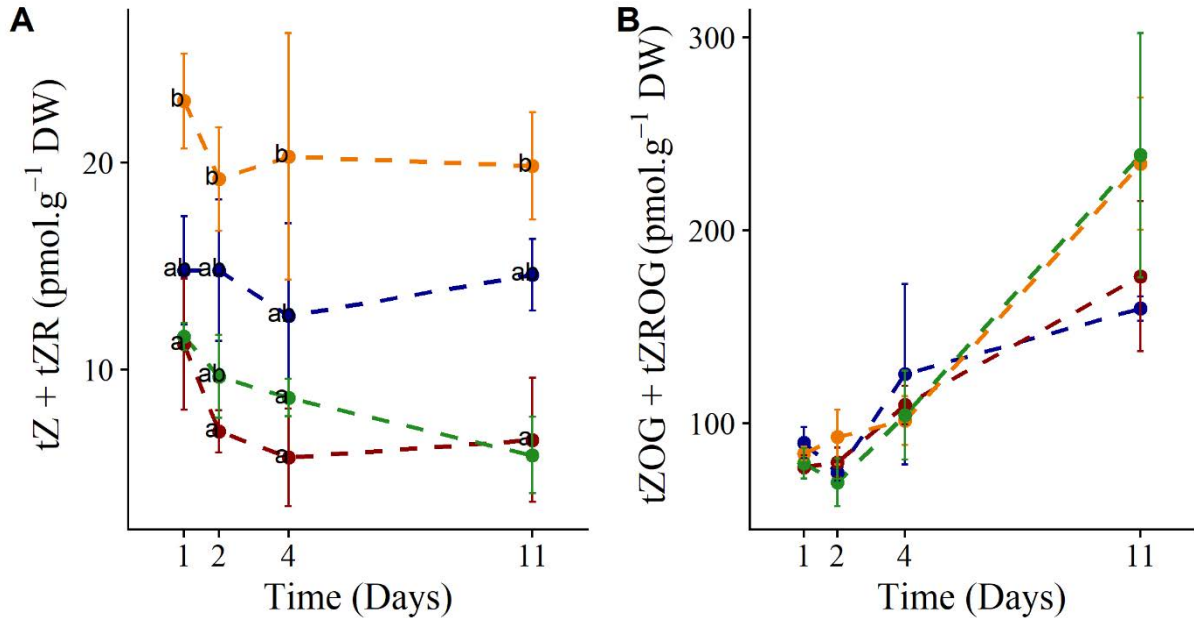


Figure 51 : Evolution des teneurs foliaires en tZs et leurs formes désactivées réversibles dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O<sub>3</sub> et/ou au déficit hydrique. La teneur en tZs (tZ + tZR) (A) et la somme des teneurs des formes désactivées réversibles (tZOG et tZROG) (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O<sub>3</sub>, rouge ; D:AF, orange ; D:O<sub>3</sub>, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres différentes représentent les différences significatives à chaque temps. Si les moyennes se chevauchent, une seule lettre est représentée.

#### *IV.4.1.3.d. Cytokinines (CKs)*

Comme décrit précédemment, les CKs semblent impactées par les traitements. Dans cette partie, nous nous intéresserons de manière détaillée à l'évolution des cis-CKs et trans-CKs. Pour la voie des cis-Z, la forme active cZR augmente sous O<sub>3</sub> : la teneur triple entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>e</sup> jour. Le 11<sup>e</sup> jour, les teneurs sont identiques au 4<sup>e</sup> (Figure 50, A). A l'inverse, pour les traitements en air filtré (WW:AF et D:AF), le contenu foliaire reste stable, autour de 2 pmol.g<sup>-1</sup> DW (Figure 50, A). Les formes désactivées de cis-zéatine (cZOG+cZROG) sont également modifiées au cours des traitements O<sub>3</sub>, avec une prédominance de la forme cZROG, 10 fois plus présente (résultats non montrés). Un effet temps est observé sur l'ensemble des traitements, avec une augmentation globale des 2 formes. En effet, sous traitement air filtré (WW:AF et D:AF), le contenu double entre le 4<sup>e</sup> et le 11<sup>e</sup> jour, tandis que, sous traitement ozone, l'augmentation est de 130 à 370 pmol.g<sup>-1</sup> DW (Figure 50, B).

En ce qui concerne la voie des trans-CKs, les teneurs foliaires en forme active (tZ +tZR) sont relativement stables au cours du temps pour tous les traitements. Les plants soumis au traitement D:AF présentent des teneurs supérieures au traitement contrôle, et cela dès le 1<sup>er</sup> jour. Les plants soumis à l'O<sub>3</sub> (D:O<sub>3</sub> et WW:O<sub>3</sub>), quant à eux, présentent des niveaux plus faibles que le traitement contrôle (Figure 51, A). Un effet temps impacte les formes désactivées de trans-zéatine (cZOG+cZROG) au cours du traitement et celles-ci sont présentes à des teneurs équivalentes. En condition de déficit hydrique (D:AF, D:O<sub>3</sub>), leur teneur double entre le 4<sup>e</sup> et le 11<sup>e</sup> jour (Figure 51, B).

### **IV.4.2. Discussion autour du rôle des phytohormones et identification de marqueurs moléculaires potentiels**

#### **IV.4.2.1. Marqueurs de la maturation de la feuille en condition contrôle**

L'expérimentation a montré que les teneurs en pigments dans les feuilles ont évolué au cours du temps : les teneurs en chlorophylles ont augmenté tandis que les anthocyanes ont diminué. Ce profil a déjà été décrit dans le chapitre précédent (III.4), il s'agit d'un indice de la maturation de la feuille (Hughes et al., 2018).

Celle-ci est également détectable au niveau de certaines phytohormones. Leur évolution est marquante entre le 4<sup>e</sup> et le 11<sup>e</sup> jour de traitement, notamment pour le précurseur de l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), dont la teneur augmente fortement à la fin de l'expérimentation. L'augmentation d'éthylène en condition contrôle dans notre expérience pourrait représenter un marqueur du passage de la feuille dans son dernier stade de développement, la sénescence (fin des gains nets en carbone et azote pour la feuille). Le rôle de

l'éthylène dans la sénescence de la feuille est d'ailleurs bien décrit dans la littérature (Davies, 2004; Pandey et al., 2000). Toutefois, il n'est pas le seul marqueur de la sénescence foliaire. L'acide salicylique (SA), dont la teneur augmente également à 11 jours, est connu pour influencer l'expression de gènes régulateurs de sénescence (Lim et al., 2007; Morris et al., 2000).

Concernant, les autres régulateurs de croissance, les voies de l'acide abscissique (ABA) et de l'auxine (IAA) semblent relativement stables au cours de l'expérimentation en conditions physiologiques normales. Pour les cytokinines (CKs), le vieillissement de la feuille ne modifie pas les teneurs des formes actives (trans- et cis-), mais les formes de stockage augmentent en fin d'expérimentation.

#### **IV.4.2.2. Régulation des voies hormonales sous O<sub>3</sub>**

Comme décrit précédemment, l'O<sub>3</sub> impacte négativement les teneurs en chlorophylles foliaires, avec une dégradation et/ou une perturbation de la synthèse de ces pigments. À l'opposé, les anthocyanes, qui ont un rôle photo-protecteur, ont moins diminué qu'en condition contrôle (WW:AF). En parallèle, la localisation tissulaire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semble indiquer un stress oxydant dès 2 jours. La chute des feuilles, les modifications des teneurs en pigments et la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont donc des indices du stress oxydant dû à l'O<sub>3</sub>.

Les effets du gaz phytotoxique sur les phytohormones dépendent fortement de la nature de celles-ci. En effet, l'O<sub>3</sub> affecte peu l'ABA et ses dérivés ; seules les teneurs en DPA augmentent après 11 jours d'exposition. Cette augmentation pourrait traduire un accroissement du catabolisme de l'ABA (Zhou et al., 2004). De plus, le DPA est décrit comme une forme inactive de l'ABA, n'agissant pas sur la fermeture des stomates (Sharkey & Raschke, 1980). Pourtant, dans nos conditions expérimentales, nous avons vu précédemment que le génotype Robusta ferme ses stomates en réponse à l'O<sub>3</sub> (Dumont et al., 2014a; Dusart et al., 2019, Chapitre IIIIV.2.3.2). Puisque les cellules de garde sont les premières en contact avec le gaz phytotoxique, une régulation de l'ABA pourrait avoir lieu de manière très localisée dans ces cellules et non détectable à l'échelle de la feuille (McAdam et al., 2017). Par ailleurs, l'O<sub>3</sub> peut être responsable de la fermeture des stomates chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana*, insensibles à l'ABA (Ahlfors, 2004; Merilo et al., 2018). Ainsi, il a été suggéré que des mécanismes indépendants de l'ABA pourraient réguler la fermeture des stomates sous O<sub>3</sub> (Kangasjärvi et al., 2005; Merilo et al., 2018).

Par ailleurs, nos résultats montrent que le gaz phytotoxique augmente la concentration foliaire d'IAA, mais également de la forme oxydée OxIAA, qui est une forme de dégradation. Le rôle

de cette dernière sous O<sub>3</sub> est méconnu, mais il pourrait être lié à une modification de l'équilibre redox de la cellule et pourrait servir à limiter la teneur en IAA si celle-ci atteignait une teneur toxique. L'auxine est en effet connue pour être responsable de la régulation de croissance et l'équilibre entre forme réduite et forme oxydée, *i.e* l'homéostasie cellulaire de l'auxine, semble jouer un rôle important pour la bonne santé de la cellule (Davies, 2004; Sauer et al., 2013).

L'O<sub>3</sub> est également responsable d'une augmentation des niveaux d'ACC et de SA. Cette augmentation est plus précoce que celle observée lors du développement normal en condition contrôle. Ces modifications peuvent être un argument en faveur de l'accélération de la sénescence par l'O<sub>3</sub>. Il est en effet connu que la triade éthylène-SA-JA joue un rôle dans la signalisation du stress O<sub>3</sub> en lien avec la détection des ROS et l'activation de cascade MAP kinases (Baier et al., 2005; Kangasjärvi et al., 2005). Dans la littérature, l'augmentation d'éthylène sous O<sub>3</sub> est liée à l'induction de la mort cellulaire chez le Tremble (Vahala, 2003b) et responsable d'une sénescence accélérée (Vahala, 2003a). Quant à SA, il jouerait un rôle antagoniste, limitant la sénescence induite par ET (Vahala, 2003a). Néanmoins, SA est également décrit comme nécessaire à l'induction de la mort cellulaire programmée (Programmed Cell Death, PCD) en contrôlant la surproduction de ROS. À l'opposé, JA limiterait l'extension des lésions en ayant un effet antagoniste à ET et SA (Kangasjärvi et al., 2005; Shigenaga & Argueso, 2016). Bien que l'interaction entre les trois hormones résulte d'un « *cross-talk* » complexe, elle est clairement reliée au stress oxydant. En effet, l'activation de la voie de signalisation de SA a été reliée au statut redox de la cellule (Janda & Ruelland, 2015), et notamment du glutathion (Rahantaniaina et al., 2017a).

Enfin, les CKs sont modifiées de manière importante sous O<sub>3</sub> au cours du temps. En effet, le gaz induit une augmentation des cZs et une diminution des tZs. Dans la littérature, les cZs sont dites moins actives que les formes trans- (Gajdošová et al., 2011). De manière intéressante, les cZs seraient responsables d'un report de la sénescence chez le maïs soumis à un stress biotique (Behr et al., 2012), ou encore de la réduction de la dégradation des chlorophylles chez l'avoine en stress hydrique (Gajdošová et al., 2011). Il a été suggéré que la fonction des cZs serait de maintenir une activité CK minimale pour maintenir certaines fonctions biologiques essentielles en condition de stress (Gajdošová et al., 2011; Schäfer et al., 2015). Néanmoins, de plus amples expérimentations sont nécessaires pour confirmer leur rôle exact (Schäfer 2015).

#### **IV.4.2.3. Régulation des voies hormonales sous déficit hydrique**

Chez Robusta, le traitement déficit hydrique est marqué par une réduction de la croissance et une diminution de la biomasse foliaire. Contrairement à l'O<sub>3</sub>, le déficit hydrique n'impacte pas

les teneurs en chlorophylles et en anthocyanes, qui suivent la même évolution qu'en condition contrôle. Par contre, la régulation hormonale est différente : par rapport à l'O<sub>3</sub>, certaines voies semblent moins ou différemment impliquées. En condition de déficit hydrique, des modifications de la voie de l'ABA étaient attendues. En effet, son rôle majeur dans le contrôle de la fermeture des stomates lors d'une sécheresse a largement été montré (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Susmilch et al., 2017). Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer une augmentation très précoce des niveaux en ABAs. Bien qu'étant un intermédiaire catabolique, le 9-OH ABA peut être d'ailleurs plus actif que l'ABA lui-même sur le contrôle de la fermeture des stomates (Zhou et al., 2004). Toutefois, dans nos conditions, cette phytohormone (et ses dérivés) pourrait être responsable d'une induction précoce des mécanismes de fermeture des stomates sous déficit hydrique. Le retour des teneurs en ABAs au même niveau physiologique que le traitement contrôle associé au maintien de la fermeture des stomates sous sécheresse sous-tend l'activation d'autres mécanismes indépendants de l'ABA mis en place sur le long terme (Brodribb & McAdam, 2011; Merilo et al., 2018).

Il semble plus étonnant que la voie de l'auxine soit peu modifiée sous sécheresse par rapport au traitement contrôle. En effet, en réponse au déficit hydrique, la littérature décrit des modifications transcriptionnelles des voies de l'auxine chez le peuplier après 10 jours de sécheresse en serre (Zhang et al. 2019) et des perturbations de l'homéostasie de l'IAA chez *Arabidopsis* (Tognetti et al., 2010). Ces modifications ont été liées au stress oxydant induit sous déficit hydrique (Tognetti et al., 2012). Un point, précédemment abordé dans Dusart et al. (2019b), concerne une possible limitation du stress oxydant dans le cadre de notre dispositif expérimental, qui dans les conditions de sécheresse appliquées, n'induirait pas un stress photo-oxydant aussi important qu'une expérimentation en conditions naturelles (section IV.2.4.2). La localisation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les disques foliaires est un argument en ce sens, puisqu'on constate une présence de coloration anecdotique en condition de déficit hydrique par rapport à celle observée aux conditions O<sub>3</sub>.

Prenant en compte cette hypothèse, un autre effet intéressant du traitement déficit hydrique est la plus faible augmentation en ACC et en SA par rapport au traitement O<sub>3</sub> et même au contrôle. Dans la littérature, des augmentations de SA sont rapportées sous sécheresse, en lien avec l'apparition de la sénescence foliaire chez des espèces herbacées (Abreu & Munné-Bosch, 2008; Munné-Bosch & Peñuelas, 2003). L'augmentation de SA est également liée au stress oxydant (Janda & Ruelland, 2015). Or, dans nos conditions, le déséquilibre du statut redox nécessaire au déclenchement de la PCD par ET et SA pourrait ne pas avoir lieu lors d'un déficit

hydrique seul. La limitation de ces deux hormones pourrait alors reporter le vieillissement foliaire. Une autre différence de réponse par rapport à l'O<sub>3</sub> tient à la teneur élevée en tZs, formes plus actives que les cZs (Gajdošová et al., 2011). Or, les tZs peuvent supprimer la dégradation des chlorophylles en condition de stress hydrique (Gajdošová et al., 2011).

Pour résumer, nos résultats en condition de déficit hydrique montrent la mise en place d'une stratégie d'évitement. Cette stratégie est directement liée à la fermeture des stomates, qui serait déclenchée par l'ABA. Rappelons que Robusta a un contrôle efficace de la fermeture des stomates sous sécheresse (Dusart et al., 2019b; Ridolfi & Dreyer, 1997). Dans nos conditions expérimentales, cette fermeture des stomates pourrait être couplée à un ralentissement de la sénescence et à une protection de la déplétion des chlorophylles par les tZs.

#### ***IV.4.2.4. Quelles interactions en combinaison de stress ?***

La combinaison de l'O<sub>3</sub> et du déficit n'a pas entraîné d'interactions significatives des deux facteurs de stress. Par contre, l'addition des effets indépendants des deux contraintes a été observée lors de l'étude de certains paramètres (Figure 52). En effet, la croissance en hauteur et en diamètre est diminuée par le déficit hydrique, tandis que les teneurs en chlorophylles et en anthocyanes suivent la réponse du traitement ozone. La localisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confirme d'ailleurs la présence de ROS en condition combinée dès le second jour de traitement. Cependant, la quantification est impossible et ne permet pas de définir une différence entre le traitement combiné et l'O<sub>3</sub> seul.

L'évolution des différentes hormones au cours de la combinaison de contraintes suit les profils observés pour les deux traitements indépendants (WW:O<sub>3</sub> et D:AF), avec toutefois quelques spécificités propres à la combinaison, notamment pour ABA et cZ.

Globalement, le métabolisme de l'IAA répond à la combinaison de la même façon que le traitement O<sub>3</sub> seul. Cette observation pourrait être liée à une signalisation spécifique, elle-même liée au déséquilibre du statut redox dû à l'O<sub>3</sub>, seul ou en combinaison.

Pour ACC et SA, les teneurs augmentent en réponse au traitement combiné, mais, à 11 jours, les niveaux tendent à être plus faibles que sous O<sub>3</sub> seul. Cela a été notamment constaté chez différentes espèces de chênes, où les teneurs de SA et ET mesurés étaient plus faibles après quelques heures en combinaison avec la sécheresse que lors d'une exposition à l'O<sub>3</sub> seul (Cotrozzi et al., 2017a; Landi et al., 2019).

Pour l'ABA, l'augmentation des formes actives est présente dans le traitement combiné, dès le premier jour, de la même manière que pour le traitement en déficit hydrique seul. Néanmoins, ce n'est que dans le cas du traitement combiné que cette augmentation perdure le deuxième

jour. Concernant le contenu en DPA, celui-ci suit la même évolution dans le traitement combiné qu'en condition d'O<sub>3</sub> seul. Précédemment, nous avons montré que la fermeture des stomates en condition combinée dépendait du déficit hydrique plus que de l'O<sub>3</sub> ; en d'autres termes, la fermeture des stomates est plus importante sous déficit hydrique que sous O<sub>3</sub> (Dusart et al., 2019b). Ce mécanisme de fermeture induit par ABA en condition de déficit hydrique seul serait également actif lors de la combinaison de traitements. Cette fermeture des stomates en combinaison de contraintes devrait donc limiter l'entrée de l'O<sub>3</sub> et donc le stress oxydant.

La modification des voies liées au CKs semble plutôt suivre le profil du traitement O<sub>3</sub> seul : les formes cZs augmentent tandis que les tZs diminuent. Néanmoins, on constate que les formes o-glucoside (cZROG, cZOG, tZROG, tZOG) augmentent par rapport au traitement O<sub>3</sub> seul. Le rôle de ces formes de désactivation est cependant encore peu connu (Spíchal, 2012).

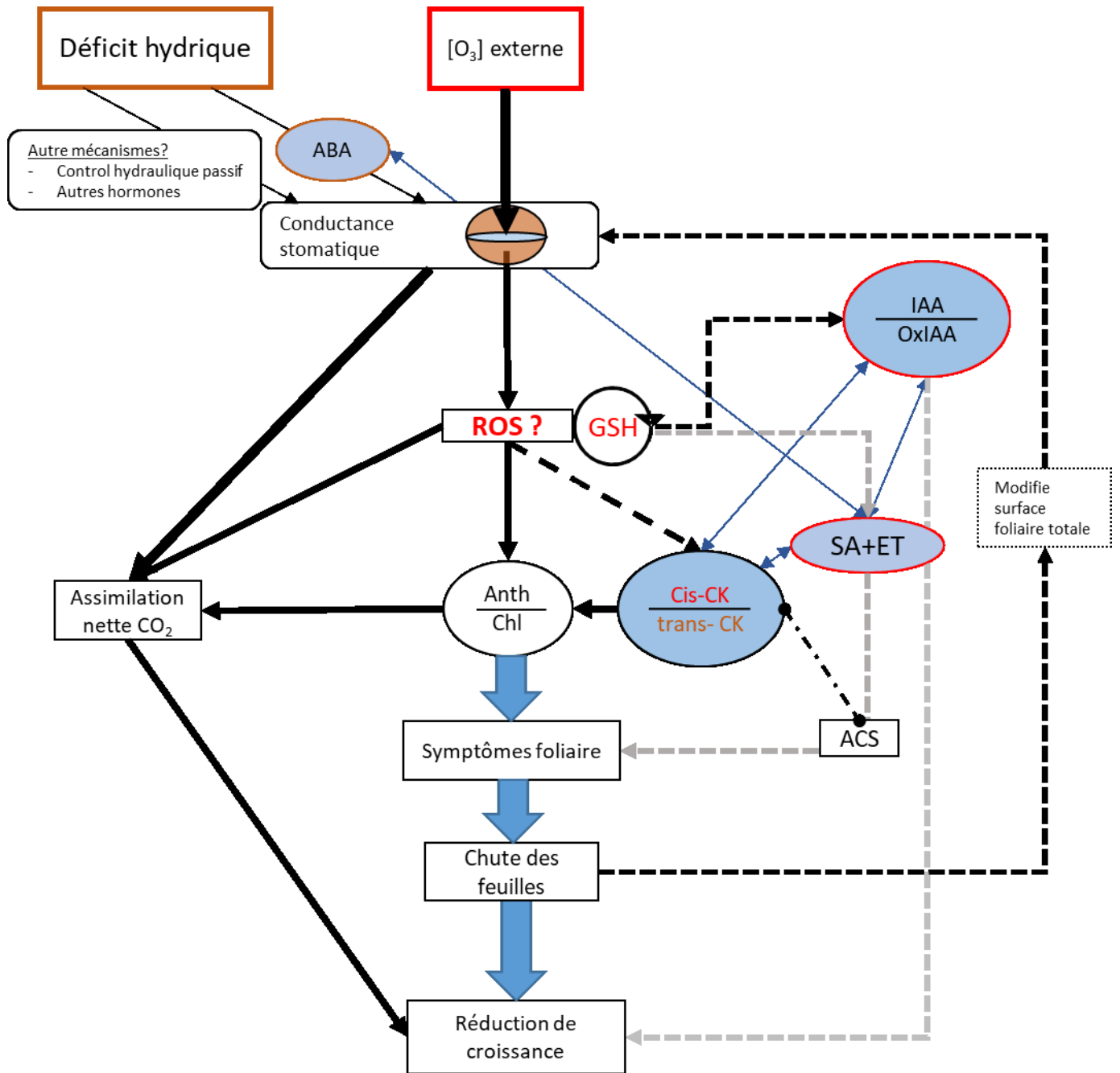


Figure 52 : Bilan schématisique de la réponse hormonale du génotype de peuplier Robusta soumis à l' $O_3$  et à la sécheresse. La taille des flèches illustre la force de l'effet. Les flèches pointillées symbolisent les relations supposées entre hormones, détoxication et les paramètres suivis par rapport à la littérature. Les flèches bleues en double sens entre hormones représentent les antagonismes possibles entre ces molécules selon la littérature. Traitements :  $O_3$  en rouge et déficit hydrique en marron. ACS, accelerated cell senescence.



On peut déduire de ces observations que la combinaison de stress montre l'addition des réponses hormonales observées pour les deux contraintes séparées. Les modifications de l'ABA sont un argument qui tend vers une réponse rapide du plant au déficit hydrique en combinaison de contraintes, tandis que la réponse à l'exposition à l'O<sub>3</sub> est plus tardive, probablement en raison d'un effet cumulatif de plus en plus prononcé au cours du temps. Seul, l'O<sub>3</sub> impacte fortement les voies IAA, ET, SA et cis-CK, ce qui pourrait être lié au stress oxydant engendré par le gaz. En combinaison de contraintes et dans des conditions proches de l'expérimentation 1, le flux d'O<sub>3</sub> entrant devrait être moins important que dans le traitement O<sub>3</sub> seul, grâce à la fermeture des stomates, stimulé par le déficit hydrique. Dès lors, les niveaux d'hormones devraient également être plus faibles. Néanmoins, dans ce cas précis, nous n'avons pas observé d'effet antagoniste de la combinaison de contraintes sur les hormones induites par l'O<sub>3</sub>. Des travaux récents sur le chêne soumis à la sécheresse décrivent certes une perturbation ou une perte du signal hormonal en réponse à un pulse d'ozone (Cotrozzi et al., 2017a; Landi et al., 2019), mais ils ne prennent pas en compte la limitation de la dose d'O<sub>3</sub> entrante dans les feuilles grâce à la fermeture des stomates en condition de déficit hydrique. La perturbation pourrait être une simple adaptation à l'intensité du stress, tandis que la perte correspondrait à l'évitement partiel du stress oxydant dû à l'O<sub>3</sub>. Caractériser l'effet de la combinaison de l'ozone et du déficit hydrique doit passer par la caractérisation du flux d'O<sub>3</sub> entrant. Néanmoins, il est vrai que, à stress oxydant induit par l'O<sub>3</sub> égal, l'addition des effets indépendants des deux facteurs de stress pourrait engendrer des modifications du « *cross-talk* » hormonal.

#### **IV.4.2.5. Perspectives de marqueurs moléculaires**

Nos résultats dressent le profil hormonal dynamique de Robusta sous un exemple de dose chronique (120 ppb/jour) d'O<sub>3</sub>, sous sécheresse et sous combinaison des deux. Pour parfaire cette analyse, il serait intéressant de coupler le profilage hormonal à une étude des transcrits à grande échelle en utilisant des techniques de séquençage d'ARN. Une étude récente décrit les résultats d'un séquençage d'ARN sur un génotype de peuplier soumis à des concentrations d'O<sub>3</sub> chronique (ambient + 40 ppb) seul ou combiné à une sécheresse (-60% d'irrigation par rapport au témoin) en chambre à ciel ouvert pendant une saison de végétation, de juin à septembre (Zhang et al., 2018). L'étude confirme l'implication des gènes des voies de signalisation et de biosynthèse de l'ABA en condition de sécheresse seule et combinée à des concentrations d'O<sub>3</sub>. Les voies de l'IAA seraient également perturbées sous déficit hydrique, tandis que les voies JA et SA seraient sur-exprimées en sécheresse et sous-exprimées sous O<sub>3</sub>. (Zhang et al., 2018). Faute de financement, nous avons opté pour une analyse future en RT-qPCR d'un ensemble de

gènes marqueurs de la biosynthèse ou de la signalisation des principales phytohormones impliquées dans la réponse à l'O<sub>3</sub> et au déficit hydrique (Tableau 12). Les ARN ont été extraits, les amorces ont été dessinées et testées en PCR en temps réel. Les analyses d'expression de gènes sont actuellement en cours.

Brièvement, les protéines impliquées dans la régulation des voies de biosynthèse et de signalisation concernent :

- La biosynthèse de l'IAA via le gène *YUCCA2*, impliqué dans la principale voie de biosynthèse.
- La biosynthèse de l'ABA via deux isoformes de *NCED3*, codant l'enzyme 9-cis-epoxycaroténoïde dioxygénase ; la voie de signalisation ABA via deux protéines phosphatase-2C (*ABI1* et *PP2C*) régulées par les ROS (Meinhard & Grill, 2001) ainsi que deux facteurs de transcription (*HB7* et *PYL4*) régulés par le déficit hydrique (Bizet et al., 2015).
- La biosynthèse de JA via *LOX3*, codant une enzyme lipoxygénase ; la signalisation JA via *JAZ1*. Les gènes de la famille JAZ agissent comme des répresseurs de facteurs de transcription, mais sont dégradés en présence de JA.
- Deux composants clés de la signalisation liée à SA : *NPR1* (Nonexpressor of Pathogenesis Related 1) et *PAD 4* (Phytoalexin Deficient4), dont l'inhibition limite la production de SA (Janda & Ruelland, 2015).
- En lien avec les CKs, 4 gènes codant pour des enzymes isopentenyl transférase (IPT) et le couple de facteurs de transcription *HK3/RR2* qui a été identifié chez *A. thaliana*. *AHK3* occupe une place majeure dans le contrôle de la longévité de la feuille par les CKs à travers la phosphorylation du gène *ARR2* (Kim et al., 2006).
- En lien avec l'ABA et ET, il semble ressortir de la littérature que les MAP kinases jouent un rôle central dans cette régulation (Baier et al., 2005; Jonak et al., 2002).

L'analyse de l'expression des gènes permettrait d'approfondir les mécanismes de régulation hormonale mis en place en réponse au stress. L'analyse ciblée par RT-qPCR est une première étape. Néanmoins, la diversité des gènes exprimés par différentes hormones et la régulation des processus physiologiques similaires par des réponses transcriptionnelles différentes (Nemhauser et al., 2006) compliquent la sélection des gènes à étudier. Pour élucider les mécanismes de signalisation hormonale, il est nécessaire de réaliser une étude globale des transcrits.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que les hormones répondaient différemment sous O<sub>3</sub> et sous déficit hydrique du sol, chaque catégorie hormonale présentant des profils distincts en réponse à chaque traitement. Cependant, de plus amples investigations sont nécessaires pour déterminer les liens manquants entre les ROS, le statut redox de certains métabolites antioxydants et les phytohormones.

Tableau 12 : Présentation des gènes d'intérêt sélectionnés en lien avec les voies de biosynthèse ou de signalisation des différentes hormones. Les gènes ont été identifiés dans la littérature et localisés sur le génome de *Populus trichocarpa* (phytozome v3). Les séquences d'amorce ont été dessinées sur le logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) et testées pour les analyses qPCR.

Gene name	Alias	Forward sequence 5' to 3'	Reverse sequence 3' to 5'	Role	Publication
<b><u>Abscisic acid</u></b>					
Potri.001G393800	<i>NCED3.1</i>	AAGACCCGGTTCGCTTACTT	CTCCGTAAGTGTGCTTGTGT	Biosynthesis	Royer et al., 2016
Potri.011G112400	<i>NCED3.2</i>	GAAAATCCCGTTTGCTTACT	ACAAAGGCTCTCCACCGAAT		
Potri.006G224600	<i>ABI1</i>	ATTTGCCTCACCAGACTGCT	TCTCCTCGGACAAAGCTGAA	ABA signalling	Durand et al., 2019
Potri.001G245200	<i>PP2C</i>	ATGGTACACAGGAGATTTACC	GCCTAGGTGCTCGATTTAGA		Cohen et al., 2010
Potri.014G103000	<i>HB7</i>	CGATGGCCTCTTCGATCAAT	TCACCAGGTGTGGAGTTCAT	Transcription factor	
Potri.016G125400	<i>PYL4</i>	GTTGTTGGTGGGGACCATA	ACCGCGTAAGACTCCATGA		Bizet et al., 2015
<b><u>Jasmonate</u></b>					
Potri.001G167700	<i>LOX3</i>	AGAGGTGTCCCAAATAGCGT	CCAAC TTTGAGCGGCCTAAA	Biosynthesis	
Potri.006G139400	<i>JAZ1</i>	GGGCTCCTCGGAATTTTACA	TTGTCAGCCGGGAAATCGTT	Transcriptional repressors in JA signalling	Royer et al., 2016
<b><u>Auxin</u></b>					
Potri.006G243400.1	<i>YUCCA2</i>	CGCCTTCACTTACCGAAACA	CGCCAAAACCCGATAGCTTT	Biosynthesis	Royer et al., 2016
<b><u>Cytokinins</u></b>					
Potri.009G147600.1	<i>IPT2</i>	GCCATTGATTTAGCAGCCCA	AGCAGAATCCCGAAAGTCCT		
Potri.014G139300	<i>IPT3</i>	GGATGAAGAAAACCGTGCCA	CACAAGCATTTCAGGCAT	Biosynthesis	Imannen et al., 2013
Potri.008G202200	<i>IPT5a</i>	AGGAATCAAGCGGGCAATTG	CGATCCGGTGCATTTTCCAA		
Potri.001G200000	<i>IPT9</i>	GCTGGCCCATTTGCATTTTG	ACAGAACATTGCGACCCCTA		
Potri.001G057400.1	<i>PtHK3a</i>	ATGCAGTTCGATTTGAGGGC	AGGAACACCATCAGACACGT	Transcription factor (control leaf senescence)	
Potri.003G171000.1	<i>PtHK3b</i>	AGGGCTTGAATGGGTTGAGA	AGCGGATCAGGAAGTCAACA		
Potri.008G193000	<i>PtRR2</i>	ACTGTTCTCATCATCAGCGC	GACGGAGAATTGCCAGCATT		Kim et al., 2006
<b><u>Salicylic acid</u></b>					
Potri.006G148100	<i>NPR1</i>	CCCAGTTCACAGGTGCATTT	TGCTACCCCACTTCTGTCTT	Transcription factor	
Potri.007G100600.1	<i>PAD4</i>	CGAAAGATGGGGTGGCAAAT	GTCCACACAAATTGCTCCGT		Janda et Ruelland, 2015
<b><u>MAPK</u></b>					
Potri.002G162500	<i>MPK4</i>	AAAGACATCATTCGGCCTCC	GTCAATTGTTGGTTGGAGCG	Negative regulator of SA	STRING data base
Potri.007G139800	<i>MPK6</i>	ATGGACACTGACCTGCATCA	GAGCCAGACCAAATCACA	ABA activate	STRING data base
Potri.017G010200					

## IV.5. Bilan du chapitre

Les deux génotypes de peuplier, Carpaccio et Robusta, présentent une réponse relativement similaire au déficit hydrique. Sous cette contraintes, les deux génotypes présentent une fermeture efficiente des stomates, un ralentissement de la croissance et l'absence de modifications du cycle HAF. L'hypothèse la plus simple pour expliquer l'absence de modification de la détoxification cellulaire consiste à penser que nos conditions expérimentales ne sont pas suffisantes pour induire un stress oxydant, et ce malgré un contrôle minutieux du déficit hydrique conduisant à la fermeture des stomates. D'après la localisation supposée de l'expression des gènes, il est également possible qu'une production de ROS localisée dans les chloroplastes ait lieu. Néanmoins, sur la base d'une visualisation de la présence de  $H_2O_2$ , cette production est incomparable à celle ayant lieu sous  $O_3$ .

Contrairement au déficit hydrique, la réponse de détoxification des deux génotypes est différente sous  $O_3$ . Pour Robusta, les mécanismes de défense sont activés plus précocement (augmentation activités DHAR et GR), alors que pour Carpaccio, la réponse est plus tardive et concerne le contenu en GSH, l'activité de la MDHAR et de la GR qui augmentent avec le flux d' $O_3$  entrant. D'après nos données pour les deux génotypes, le métabolisme du GSH, plus que celui de l'AsA, apparaît comme un processus clé de la réponse à l' $O_3$ . Enfin, les différences observées entre les génotypes semblent provenir d'importantes différences de flux d' $O_3$  entrant dans la feuille lors de l'expérimentation.

Lors de la combinaison simultanée de l' $O_3$  et du déficit hydrique, nous avons montré un effet antagoniste sur la majeure partie des mécanismes de détoxification. Cependant, il ne faut pas négliger la présence d'un effet additif sur la croissance (- 30 % de perte de productivité en 17 jours) dû au déficit hydrique du sol. En parallèle, l'étude sur l'effet de la combinaison de l' $O_3$  et la sécheresse sur le chêne révèle un effet antagoniste sur la plupart des traits biochimiques étudiés, conséquence d'une diminution du flux d'ozone entrant par la sécheresse. Cependant, dans cette étude, l'exposition à la combinaison de contraintes induit une accumulation de ROS ( $H_2O_2$  et  $O_2^-$ ). Dans des conditions d'éclairement naturelles, le déficit hydrique permet certes de limiter le flux d' $O_3$  entrant, mais augmente le risque de stress photo-oxydant et donc la production de ROS. Pour les 3 espèces de chênes, la défense antioxydante est en place et maintenue mais n'est pas suffisante pour contrer les effets de l' $O_3$ . *Q. ilex* semble être le moins impacté par l' $O_3$ , sûrement grâce à la fermeture des stomates, qui donne lieu un  $POD_0$  plus faible au terme des 4,5 mois d'exposition à l' $O_3$ . La stratégie d'évitement mise en place par *Q. ilex* permet donc à l'arbre de ne pas être dépassé par le stress oxydant.

Toutefois, nos résultats liés aux teneurs en AsA et en GSH chez le chêne et le peuplier ne permettent pas à eux seuls de déterminer quelle espèce est la plus tolérante/sensible. L'AsA, souvent cité comme l'antioxydant le plus important, n'est pas suffisant pour expliquer des différences de tolérance à l'O<sub>3</sub>. En effet, l'action coordonnée d'un ensemble de métabolites doit être prise en compte, et notamment l'importance des enzymes dans la régénération de ces métabolites. La première partie du chapitre ainsi que de nombreuses publications soulignent le rôle majeur des enzymes du cycle HAF dans la détoxification cellulaire (Dusart et al., 2019b; Eltayeb et al., 2006; Gandin et al., 2019; Pasqualini et al., 2001; Rahantaniaina et al., 2017a). Même si le contenu en GSH augmente souvent sous O<sub>3</sub>, il faut prendre en compte que le pourcentage de réduction peut diminuer (Pasqualini et al., 2001). De plus, il est important de conserver à l'esprit que les ratios AsA/(M)DHA et GSH/GSSG représentent un état stable, quantifié à un moment donné. Cet état peut cacher des processus enzymatiques qui peuvent rapidement régénérer, utiliser ou dégrader ces métabolites (Flohé, 2013). Par exemple, le GSH est impliqué dans un réseau de plus de 100 enzymes (Jacquot et al., 2013; Rahantaniaina et al., 2013).

À ces mécanismes de détoxification complexes, il faut ajouter des mécanismes de signalisation tout aussi complexes. Ces derniers vont moduler la réponse de l'arbre. Comme décrit précédemment, l'O<sub>3</sub> et la sécheresse sont responsables de modifications différentes et spécifiques des teneurs des phytohormones étudiées. La réponse résultant d'une exposition de quelques jours à l'O<sub>3</sub> pourrait être liée au déclenchement par le stress oxydant de mécanismes de sénescence accélérée impliquant les CKs, SA et l'ET. À l'inverse, sous sécheresse, la fermeture des stomates serait due à l'augmentation de l'ABA (et d'autres mécanismes) et les CKs pourraient être impliquées dans des mécanismes de ralentissement de la sénescence et d'évitement du stress. Les mécanismes ainsi mis en place et le « *cross-talk* » nécessitent de plus amples recherches. Cependant, au vu des mécanismes d'antagonisme existant entre les différentes hormones, la réponse aux stress combinés pourrait être modifiée, notamment pour le contrôle de la sénescence accélérée. Malgré cela, des mécanismes secondaires pourraient permettre le maintien de certaines fonctions, par exemple, la fermeture des stomates malgré l'antagonisme entre ET et ABA.

Pour conclure, la réponse des arbres aux stress combinés semble être majoritairement antagoniste sur les paramètres biochimiques. Cependant, cet effet est la résultante de la diminution du flux d'O<sub>3</sub> entrant induit par le déficit hydrique, d'où l'importance de comparer les plantes en fonction de leur capacité à limiter le flux d'ozone par la fermeture des stomates

et de comparer leur capacité de signalisation et de détoxification en fonction du  $POD_0$ . Évidemment, l' $O_3$  et la sécheresse ont un effet négatif sur les capacités de la plante. L'intensité et la durée de l'exposition aux deux contraintes peuvent fortement impacter les arbres sur le long terme.

## **Chapitre V. Réponse du peuplier soumis à une succession ozone & sécheresse**

---



## V.1. Introduction du chapitre

Dans les conditions naturelles, il est très probable d'observer un épisode de concentration d'O<sub>3</sub> relativement élevé au printemps juste avant une sécheresse estivale. L'O<sub>3</sub> pourrait alors affecter la réponse des arbres à la sécheresse, notamment à travers le ralentissement de la fermeture des stomates. En effet, l'O<sub>3</sub> est connu pour ralentir la fermeture des stomates en réponse à des facteurs environnementaux, modifiant ainsi la transpiration des végétaux (Hoshika et al., 2015). Or, la perturbation du fonctionnement des stomates par le déficit hydrique et l'O<sub>3</sub> peut également augmenter la perte en eau et le flux d'O<sub>3</sub> entrant (Hoshika et al., 2013). Il est donc pertinent de s'intéresser aux conséquences qu'aurait un ralentissement de la fermeture des stomates sur la réponse de la plante dans le cas d'une succession de contraintes O<sub>3</sub> et sécheresse. Ce ralentissement des stomates, appelé « stomatal sluggishness », a été observé en réponse à des changements de lumière (Dumont et al., 2013; Paoletti & Grulke, 2010), au VPD (Dumont et al., 2013; Grulke et al., 2007) et au déficit hydrique du sol (Durand et al., 2019a; Gérardin et al., 2018; Hoshika et al., 2013).

Pour mieux comprendre le « stomatal sluggishness » et son impact sur la réponse de la plante, nous avons mis en place une expérimentation permettant de mettre en évidence les mécanismes d'ouverture/fermeture des stomates en réponse à des variations de la lumière et du déficit hydrique à la vapeur d'eau (VPD) sous différentes contraintes : O<sub>3</sub>, déficit hydrique du sol et la succession des deux. Les deux géotypes Carpaccio et Robusta ont été exposés aux différents traitements pendant 21 jours (section II.1.5). Les arbres ont été soumis à une fumigation d'O<sub>3</sub> de 80 ppb/jour pendant 13 jours, puis à un stress hydrique modéré pendant 7 jours. L'objectif était de déterminer i) si l'O<sub>3</sub> et/ou le déficit hydrique du sol modifiaient la réponse des stomates à la lumière et au VPD ; ii) si l'O<sub>3</sub> modifiait la réponse des stomates à la sécheresse. Pour cela, des mesures de courbes de réponse des stomates à la lumière et au VPD ont été réalisées (section II.2.3). Cette première partie a été soumise à publication et est présentée ci-après sous forme d'article. Une seconde partie traitera de l'évolution des niveaux d'AsA et de GSH en réponse à la succession de traitements, l'objectif étant de valider la méthode de détermination par HPLC chez le peuplier et de déterminer la réponse de ces deux antioxydants majeurs à la succession de contraintes, O<sub>3</sub> puis sécheresse. Les teneurs en AsA et en GSH ont été déterminées par HPLC à la fin des 13 jours de traitement O<sub>3</sub> et à la fin de l'expérimentation, après 21 jours de traitement.

## V.2. Altered stomatal dynamics of two Euramerican poplar genotypes submitted to successive ozone exposure and water deficit

Les résultats ont été soumis dans la revue *Environmental Pollution* :

Dusart N., Vaultier M.-N., Olry J.-C., Buré C., Gérard J., Jolivet Y., Le Thiec D., 2019, *Altered stomatal dynamics of two Euramerican poplar genotypes submitted to successive ozone exposure and water deficit*.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.110>

### Abstract

The impact of ozone (O<sub>3</sub>) pollution events on the plant drought response needs special attention because spring O<sub>3</sub> episodes are often followed by summer drought. By causing stomatal sluggishness, O<sub>3</sub> could affect the stomatal dynamic during a subsequent drought event. In this context, we studied the impact of O<sub>3</sub> exposure and water deficit (in the presence or in the absence of O<sub>3</sub> episode) on the stomatal closure/opening mechanisms relative to irradiance or vapour pressure deficit (VPD) variation. Two genotypes of *Populus nigra* x *deltoides* were exposed to various treatments for 21 days. Saplings were exposed to 80 ppb/day O<sub>3</sub> for 13 days, and then to moderate drought for 7 days. The curves of the stomatal response to irradiance and VPD changes were determined after 13 days of O<sub>3</sub> exposure, and after 21 days in the case of subsequent water deficit, and then fitted using a sigmoidal model. The main responses under O<sub>3</sub> exposure were stomatal closure and sluggishness, but the two genotypes showed contrasting responses. During stomatal closure induced by a change in irradiance, closure was slower for both genotypes. Nonetheless, the genotypes differed in stomatal opening under light. Carpaccio stomata opened more slowly than control stomata, whereas Robusta stomata tended to open faster. These effects could be of particular interest, as stomatal impairment was still present after O<sub>3</sub> exposure and could result from imperfect recovery. Under water deficit alone, we observed slower stomatal closure in response to VPD and irradiance, but faster stomatal opening in response to irradiance, more marked in Carpaccio. Under the combined treatment, most of the parameters showed antagonistic responses. Our results highlight that it is important to take genotype-specific responses and interactive stress cross-talk into account to improve the prediction of stomatal conductance in response to various environmental modifications.

### V.2.1. Introduction

Forest health depends at least on our capacities to improve risk assessment. This evaluation depends on our understanding of tree biological and physiological responses to multiple environmental stressors (Sicard et al., 2016a). Among abiotic stress factors, tropospheric ozone ( $O_3$ ) and drought are detrimental for tree growth and health (Allen et al., 2010; Wittig et al., 2007).  $O_3$  is a phytotoxic air pollutant that impairs gas exchanges and reduces plant biomass (Dizengremel et al., 2013; Jolivet et al., 2016; Wittig et al., 2007). It is a secondary pollutant resulting from a photochemical process in the troposphere, with an annual cycle: higher daily  $O_3$  concentrations are reported in spring and summer, lower ones in autumn and winter. Recurrent spring maxima have been reported in the northern hemisphere (Kalabokas et al., 2017; Monks, 2000; Parrish et al., 2013). On the other hand, drought events are predicted to increase in the near future. Due to global warming, wet regions are becoming wetter and dry regions drier (Liu & Allan, 2013). A reduction of primary growth was observed following the 2003 drought and heat wave (Ciais et al., 2005). Stand mortality was reported all over the world (Allen et al., 2010). Models integrating temperature, vapour pressure deficit (VPD) and rainfall predict an increased probability of similar events in the near future (IPCC, 2014; Lehner et al., 2006; Park Williams et al., 2013). Against this environmental fluctuation, the main physiological responses of trees and more generally plants are the control of transpiration by stomata. In the case of  $O_3$ , stomatal closure limits  $O_3$  entrance. Under drought, stomatal closure prevents water loss. Nevertheless, there is a cost for carbon assimilation under both constraints. Stomata exert a major control on both the water and carbon cycles round the world (Hetherington & Woodward, 2003).

Meta-analyses of published data indicate that ambient  $O_3$  reduces tree biomass production (Li et al., 2017; Wittig et al., 2009), while an analysis of survey data showed how  $O_3$  reduces tree growth (Braun et al., 2014). Different metric indicators have been created to assess critical levels of  $O_3$  for plants. The simplest ones were only based on cumulative exposure levels. The USA selected the SUM-index (sum of all hourly average concentrations over  $X$  ppb), whereas the EU selected the AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb) which takes into account hourly  $O_3$  concentrations above 40 ppb *per* hour when irradiance is  $50 \text{ W.m}^{-2}$  minimum (Fuhrer et al., 1997; Musselman et al., 2006). The advantage of these metrics is that they make it simple to determine exposure levels only based on  $O_3$  concentration data. In the early 2000's, the biologically more relevant concept of flux-based approach emerged, resulting in the

scientific adoption of the Phytotoxic Ozone Dose over a threshold of  $Y \text{ nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (POD<sub>y</sub>) (Emberson et al., 2007; Hayes & Bangor, 2017; Karlsson et al., 2000; Mills et al., 2011). This metric is available for risk assessment and takes O<sub>3</sub> uptake by the leaves through stomata into account. The DO<sub>3</sub>SE model (Deposition of O<sub>3</sub> for Stomatal Exchange) was developed to account for the variation in stomatal opening and closure with climate, soil, and plant factors (Büker et al., 2012; Emberson et al., 2007); it is based on the empirical Jarvis-type stomatal conductance model (Jarvis, 1976). This model was developed using steady-state parameters, and the stomatal dynamic modification specifically induced by O<sub>3</sub> was ignored (Hoshika et al., 2013). Tropospheric O<sub>3</sub> is known to slow down the stomatal responses to environmental factors, named stomatal sluggishness. Stomatal sluggishness has been reported in response to changes in light (Dumont et al., 2013; Paoletti & Grulke, 2010), VPD (Dumont et al., 2013; Grulke et al., 2007), and soil water stress (Durand et al., 2019a; Gérardin et al., 2018; Hoshika et al., 2013). Hoshika et al. (2017) showed that stomatal sluggishness and closure should be taken into account in stomatal response modelling in a Jarvis-type model. O<sub>3</sub>-induced stomatal sluggishness potentially increases transpiration (Hoshika et al., 2015). O<sub>3</sub>- and drought-induced loss of stomatal function may enhance both leaf water loss and O<sub>3</sub> uptake (Hoshika et al., 2013). In natural conditions, an O<sub>3</sub> spring episode is very likely before summer drought in Europe. Plants subjected to O<sub>3</sub> stress in spring can be particularly sensitive to drought events in summer (Pollastrini et al., 2014). O<sub>3</sub> could affect the stomatal dynamic under drought by causing stomatal sluggishness. The present study aims to decipher the response of stomatal closure/opening relative to light or vapour pressure deficit variation in O<sub>3</sub> and in water deficit stress conditions (with or without previous O<sub>3</sub> stress). The two *Populus deltoides* x *nigra* (Moench.) genotypes (“Carpaccio” and “Robusta”) were documented in our recent experiments under 120 ppb O<sub>3</sub> as being impaired in radial growth and gas exchanges, and exhibiting increased visible leaf injuries and senescence, and changes in detoxification capacities (Dghim et al., 2013; Dumont et al., 2014a, 2014b, 2013; Dusart et al., 2019b). Better stomatal control has been observed under O<sub>3</sub> in the Carpaccio genotype as compared to Robusta (Dumont et al., 2013), while both genotypes showed efficient stomatal closure under soil water deficit (Durand et al., 2019a; Dusart et al., 2019b; Ridolfi & Dreyer, 1997). The present paper addresses the following questions: i) are any of the differences in stomatal dynamics linked to environmental variables (light, VPD) between the two poplar genotypes?, ii) does 80 ppb O<sub>3</sub> or water deficit induce stomatal sluggishness in poplar?, iii) does O<sub>3</sub> treatment modify water-deficit-induced stomatal closure?, and iv) does stomatal dynamics recover after 7 days in the absence of O<sub>3</sub> treatment?

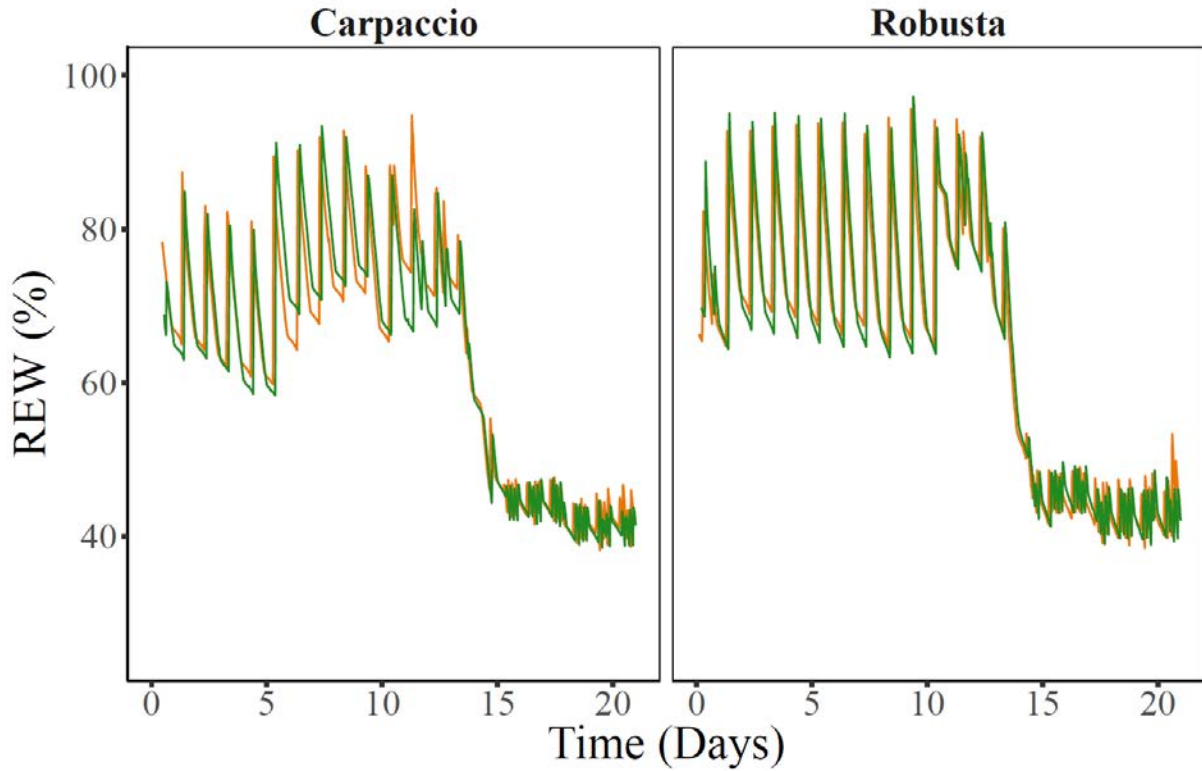


Figure 53 : Evolution of the soil relative water content (REW) calculated from soil water humidity for the Carpaccio and Robusta genotypes and for the water deficit treatments. Orange, D:FA; green, D:O<sub>3</sub>.

Tableau 13 : Average O<sub>3</sub> exposure represented by SUM00 (sum of hourly O<sub>3</sub> concentrations) and AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb) as well as metric dose (POD<sub>0</sub>, Phytotoxic Ozone Dose above a threshold flux of 0 nmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at the end of the fumigation period for Robusta and Carpaccio. Values are means of the four fumigation chambers. The “water used” values are the amounts of water consumed by each plant for 21 days, taking the cumulative sum of the amount of water added for each plant every day into account (n=6). FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Genotype	Water treatment	Ozone treatment	SUM00 (ppm.h <sup>-1</sup> )	AOT40 (ppm.h <sup>-1</sup> )	POD <sub>0</sub> (mmol.m <sup>-2</sup> )	Water used (L)
Carpaccio	WW	FA				11.39
Carpaccio	WW	O <sub>3</sub>	13.30	5,93	9.68	11.28
Carpaccio	D	FA				8.46
Carpaccio	D	O <sub>3</sub>	13.30	5,93	9.74	8.36
Robusta	WW	FA				11.47
Robusta	WW	O <sub>3</sub>	12.58	5.58	11.40	11.88
Robusta	D	FA				10.09
Robusta	D	O <sub>3</sub>	12.58	5.58	11.60	9.54

## V.2.2. Materials and methods\*

### V.2.2.1. *Plant material and exposure conditions*

Cuttings of the two Euramerican poplar genotypes “Carpaccio” and “Robusta” were grown in growth chambers as already described in Dusart et al. (2019b) with slight modifications. Cuttings were planted in ten-liter pots filled with a sand/peat mixture (1/1, v/v) and fertilised by adding 15 g of slow-release nutritive granules (Nutricot T-100) and 1 g.L<sup>-1</sup> CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. For both genotypes, forty-eight plants were randomly distributed in eight phytotronic chambers, i.e. twenty-four plants in control chambers (charcoal-filtered air), and twenty-four plants in chambers set for O<sub>3</sub> treatment (80 nmol.mol<sup>-1</sup> for 13 hours, from 09:00 to 22:00). For reasons of space in the culture chambers and length of measurement times, the experiment was duplicated separately for each genotype. After a 7-day-long acclimation period, the O<sub>3</sub> treatment started while control saplings were exposed to charcoal-filtered air for 13 days. After 13 days (d) of fumigation, the total cumulative sum of O<sub>3</sub> flux (SUM00), the cumulative O<sub>3</sub> dose above a threshold of 40 ppb (AOT 40), and the phytotoxic O<sub>3</sub> dose above a threshold flux of 0 nmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (POD<sub>0</sub>) (based on measured stomatal conductance, see Bagard et al., 2015) were determined (Tableau 13). At the end of the O<sub>3</sub> exposure period, half of the saplings were submitted to a moderate water deficit for 7 d. Soil Water Content (SWC) was determined with 24 wireless Time Domain Reflectometry (TDR) probes (CWS655E, Campbell Scientific Ltd, Antony, France). A calibration between volumetric SWC measured by TDR and pot weight was performed. The biological available water was expressed as relative extractable water (REW), as described by Wildhagen et al. (2018) for the same soil. Poplars were watered with a known volume of water several times a day to maintain the level of REW stable. For the well-watered treatment, poplars were irrigated at 75 % (±10%) of REW, whereas for the water deficit treatment, irrigation was set to 45% (± 2%) of REW until the end of the experiment (Figure 53). A cumulative sum of the amount of water added for each treatment for 21 d is presented in Tableau 13.

### V.2.2.2. *Plant growth*

The number of leaves and the diameter at the collar and height were recorded twice a week until the end of the experiment for each individual. At the end of the experiment, leaves, stems and roots were oven-dried at 60 °C until they reached a constant dry mass.

---

\* N.D.A : Cette partie étant incluse dans l'article en anglais, elle est redondante avec le Chapitre II Matériels et méthodes, excepté pour les informations plus précises concernant la mise en place de l'expérimentation (cf. Tableau 13 et Figure 53)

### V.2.2.3. *Gas exchanges and photosynthetic pigment kinetics*

Gas exchanges ( $A_n$ , net CO<sub>2</sub> assimilation, and  $g_s$ , stomatal conductance to water vapour) were measured using a Li-6200 (Li Cor, Lincoln, NE, USA) as described in Dusart et al. (2019b). Non-destructive determination of the chlorophyll pigment content was performed with a Dualex (Force-A, Orsay, France). For all non-destructive leaf measurements, the same leaf was used, i.e., the first fully expanded leaf (the 10th leaf from the apex) at the beginning of the O<sub>3</sub> treatment.

### V.2.2.4. *Stomatal response to irradiance and vapour pressure deficit*

#### V.2.2.4.a. *Gas exchange measurements*

Gas exchange measurements were performed with a Li-6400 system, as described in Durand et al. (2019) with some minor modifications. Parameters of the leaf cuvette were for light: PAR: 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of blue irradiance and VPD: 0.8 kPa, until  $g_s$  reached a steady state ( $g_0$ , defined as a variation lower than 5% over 5 minutes). Then light was turned off (as well as in the phytotronic chamber) until  $g_s$  got to a new steady state ( $g_1$ ), then turned on to 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  until stomatal conductance reached the last steady state ( $g_2$ ). The 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  value was chosen to avoid photoinhibition due to excess light (Niinemets & Kull, 2001). A similar procedure was used to monitor  $g_s$  response to a change of VPD: it was switched to 3 kPa instead of 0.8 kPa (for a fixed PAR: 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). VPD from leaf tissues to air was controlled with a dew point generator as described in Vialet-Chabrand et al. (2013).

#### V.2.2.4.b. *Modelling*

The obtained stomatal response curves were fitted using the following sigmoidal model (Vialet-Chabrand et al., 2013):

$$g_s = g_0 + (G - g_0) e^{-e^{\left(\frac{\lambda-t}{\tau}\right)}}$$

where  $g_s$  is the fitted stomatal conductance,  $g_0$  and  $G$  are the steady-state values of  $g_s$  ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), respectively at the start and at the end of the curve,  $\tau$  is a time constant (s),  $\lambda$  is the lag time (s), and  $t$  is time (s). The speed of the stomatal response was estimated by calculating the maximum slope ( $SL_{\text{max}}$ ), as follows:

$$SL_{\text{max}} = \frac{G - g_0}{\tau \cdot e}$$

where  $(G-g_0)$  represents the amplitude of the stomatal response and  $e$  is Euler's number ( $e \approx 2.718$ ). Further information regarding the model parameters and fitting procedure can be found in Gérardin et al. (2018) and Durand et al. (2019).

#### V.2.2.5. *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using R 3.1.0 (R Development Core Team) open-source software. Linear models created from the *nlme* package (Pinheiro et al., 2018) were used to study growth parameters with ANOVA, including the effects of water deficit, O<sub>3</sub> and genotype. The growth chamber was also tested and excluded from the models because the effect was not significant for all the parameters tested throughout the whole experimental period. Model parameters,  $G$ ,  $g_0$ ,  $\lambda$ ,  $\tau$ ,  $SL_{\max}$  were explored in the same way. The *lme4* package (D. Bates et al., 2015) was used to fit a linear mixed-effect model on gas exchange and chlorophyll content data with fixed variables (water deficit and O<sub>3</sub> data) whereas biological replicas were random variables. Residual plots of the model were used to assumed heteroscedasticity and variance homogeneity. The *emmeans* package (Lenth, 2016) was used to perform multiple comparisons. To determine if O<sub>3</sub> and water deficit had an additive, synergistic or antagonistic impact on  $g_s$ , we compared the observed effects to the expected additive effects for the saplings exposed to O<sub>3</sub> and then to water deficit (Methods 1 available in Supplementary data).



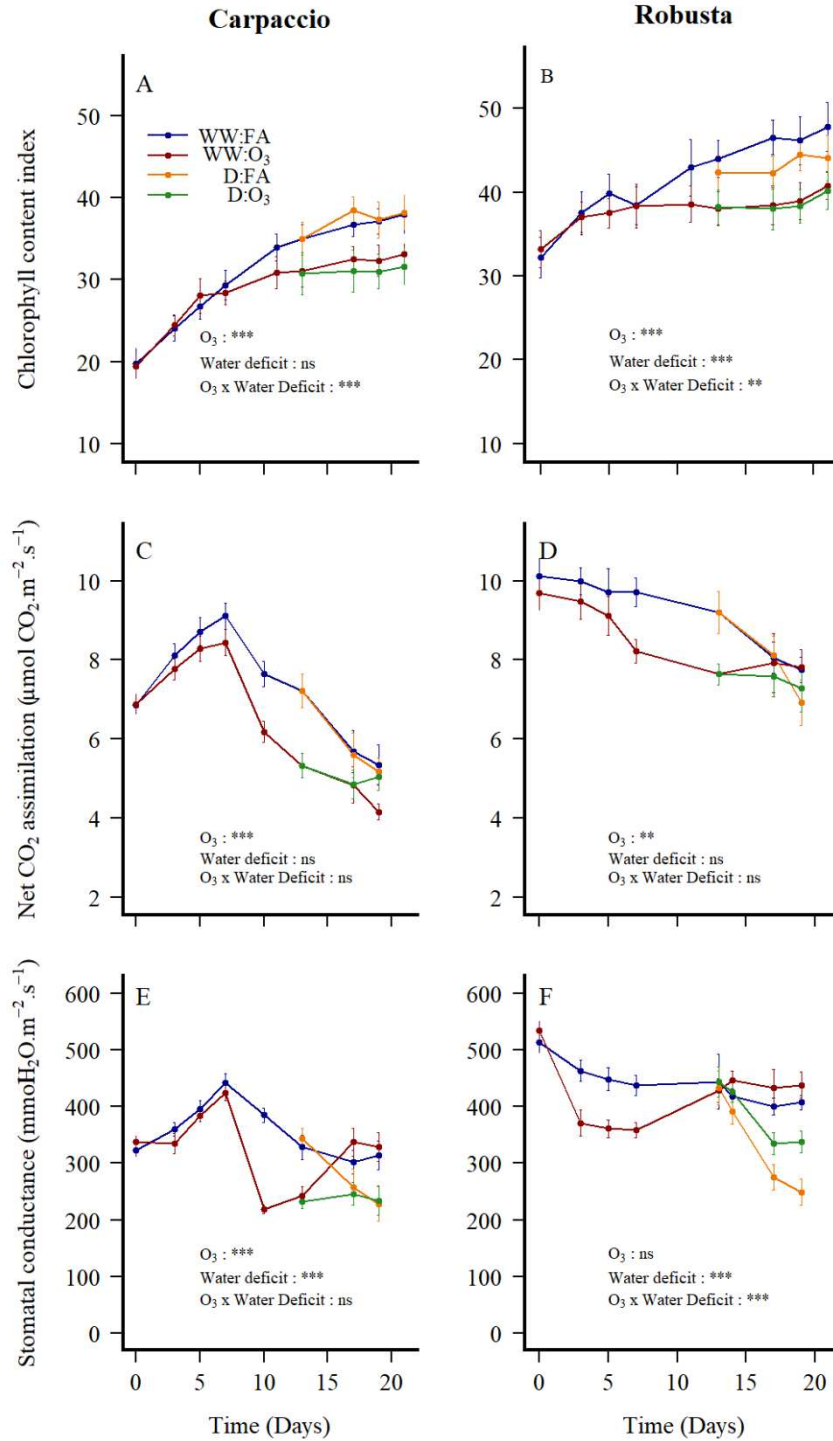


Figure 54 : Impact of O<sub>3</sub> or/and water deficit on total chlorophylls (A, B), net CO<sub>2</sub> assimilation (C, D) and stomatal conductance to water vapour (E, F). Measurements were conducted on leaves of the Carpaccio and Robusta genotypes two to three times a week. For chlorophyll contents, results are presented in arbitrary units obtained with Dualex. Means ± se, n ≥ 4. Blue, WW:FA; orange, D:FA; red, WW:O<sub>3</sub>; green, D:O<sub>3</sub>. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone. Asterisks indicate the significance of the factors or their interactions tested by a linear mixed-effect model: \*\*\*\*P ≤ 0.001, \*\*\*P ≤ 0.01, \*\*P ≤ 0.05, 'ns' non-significant.

### V.2.3. Results

#### V.2.3.1. *Effect on growth, chlorophyll contents and gas exchange kinetics*

O<sub>3</sub> impacted only the stem biomass of the two genotypes. Water deficit only slightly impacted the number of leaves of Robusta genotype, nevertheless leaf surface area decreased in the Carpaccio genotype only (Table S1).

An increase in chlorophyll contents was observed in both genotypes under the WW:FA modality throughout the 21 days of the experiment (Figure 54A and B), and Robusta systematically contained 1.5 times more chlorophyll than Carpaccio. Chlorophyll contents were significantly lower under O<sub>3</sub> treatment in both genotypes; from 11 days, chlorophyll levels remained lower than the control treatment (Figure 54A and B). The chlorophyll content of the water deficit treatment (D:FA) was significantly lower in Robusta as compared to the WW:FA modality (Figure 54A and B). D:O<sub>3</sub> impacted chlorophyll contents similarly to WW:O<sub>3</sub>.

Concomitantly, gas exchanges were recorded twice or three times a week (Figure 54C and D). The control treatment values decreased throughout the experiment because the leaves received less light (because the upper leaves were still growing). Although net CO<sub>2</sub> assimilation (A<sub>n</sub>) decreased over time, A<sub>n</sub> values were 3 μmol CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> higher in the Robusta genotype. ANOVA on A<sub>n</sub> only showed a significant effect of O<sub>3</sub> on both genotypes (Figure 54C and D). O<sub>3</sub> decreased A<sub>n</sub>, from 10 d in Carpaccio and 6 d in Robusta. After the O<sub>3</sub> treatment was switched off on d 13, Robusta photosynthesis reached the same levels as the control, *i.e.*, 7.5 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Concerning stomatal conductance values, O<sub>3</sub> decreased g<sub>s</sub> from 6 d in Carpaccio and 2 d in Robusta, with a significant effect only on Carpaccio (Figure 54E and F). At the end of the 13 d of O<sub>3</sub> fumigation, g<sub>s</sub> went back to the control level in both genotypes, *i.e.*, 400 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> and 300 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> in Robusta and Carpaccio, respectively. Water deficit decreased g<sub>s</sub> (around 230 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) in both genotypes (Figure 54E and F). Carpaccio stomata displayed similar conductance values under the D:FA and D:O<sub>3</sub> conditions. A difference was observed in Robusta, *i.e.*, stomata under D:O<sub>3</sub> were less closed than under D:FA (330 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, Figure 54F), resulting in a significant interaction between O<sub>3</sub> exposure and water deficit.

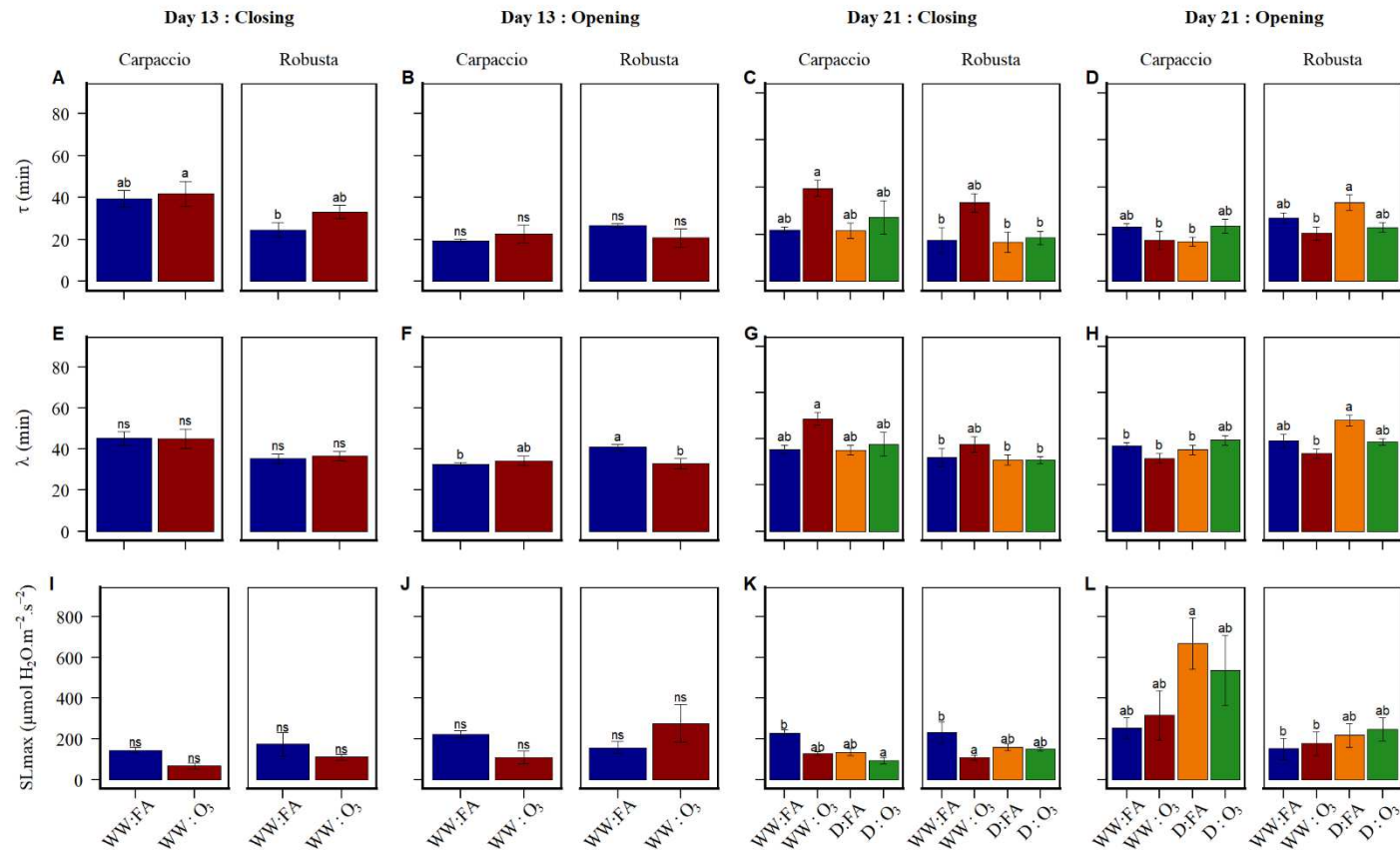


Figure 55 : Sigmoidal model parameters of stomatal dynamics in response to irradiance changes in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes after 13 days (A, B, E, F, I, J), or 21 days (C, D, G, H, K, L) when submitted to 80 ppb of O<sub>3</sub> for 13 days and/or water deficit for an additional week. (A, B, C, D): τ, response time(s); (E, F, G, H): λ, lag time(s); (I, J, K, L): SL<sub>max</sub>, maximum slope (mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-2</sup>). Means ± se, n ≥ 4. Letters show the significance levels between treatments and genotype; ns, not significant. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone. ANOVA, P-values are available in Table S3.

### V.2.3.2. *Effect of O<sub>3</sub> and recovery of stomatal behaviour*

#### V.2.3.2.a. *Responses to irradiance*

At the end of the O<sub>3</sub> treatment (13 d), net CO<sub>2</sub> assimilation in steady state 0, *i.e.*, A<sub>0</sub>, was down from 19.6 to 7.9 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> in Carpaccio, and from 19.2 to 15.05 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> in Robusta (Table S2). The steady states of g<sub>s</sub> after stomatal closure (g<sub>1</sub>) were similar for both genotypes and treatments (around 100 mmol.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). After stomatal closure, net CO<sub>2</sub> assimilation reached negative values (A<sub>1</sub>) due to dark respiration (Table S2). The respiration rates in FA conditions were higher in Robusta than in Carpaccio (-1.6 vs. -1.3 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Under WW:O<sub>3</sub> conditions, an increase of respiration was observed, *i.e.*, +30% and +18% in Carpaccio and Robusta, respectively. Concerning the stomatal closure phase, the τ and λ parameters were not modified by O<sub>3</sub> treatment in Carpaccio (Figure 55A and E). In Robusta, τ tended to increase under O<sub>3</sub> exposure (1.5 fold) (Figure 55A) and λ was not modified (Figure 55E). Moreover, λ values differed between genotypes, with a higher value for Carpaccio (1.2-fold higher) (Figure 55E). SL<sub>max</sub> values highlighted a trend for an O<sub>3</sub> effect: the stomatal closure speed was reduced by 0.5 fold and 0.4 fold in Carpaccio and Robusta, respectively (Figure 55I). As regards the stomatal opening phase, λ was 6 min faster in Carpaccio than in Robusta (Figure 55F). λ was not impacted by O<sub>3</sub> in Carpaccio, whereas it significantly decreased by 25% in Robusta. SL<sub>max</sub> values significantly differed between the two genotypes (Table S4). Stomatal opening was slower in Carpaccio, with an SL<sub>max</sub> 0.5 fold lower under O<sub>3</sub>, but changes were not significant in Robusta (Figure 55J). The steady states of conductance (g<sub>2</sub>) after the opening phase (Table S2) returned to the same levels as the first steady states in Carpaccio. In Robusta under O<sub>3</sub>, g<sub>2</sub> was 30% lower than g<sub>0</sub> before stomatal closure (Table S2). Similarly, assimilation went back to the same levels (A<sub>0</sub>=A<sub>2</sub>) in the control leaves (Table S4).

After a week without O<sub>3</sub> exposure (21 d), net CO<sub>2</sub> assimilation (A<sub>0</sub>) went back to the same level as the control in Carpaccio, whereas a 20% decrease in CO<sub>2</sub> uptake was observed in Robusta as compared to the WW:FA modality (Table S2). In parallel, g<sub>0</sub> was the same under the O<sub>3</sub> and control treatments in Carpaccio. As for Robusta, g<sub>0</sub> was higher under O<sub>3</sub>, and stomata opened 31% more (Table S2). During stomatal closure, τ and λ values in the WW:O<sub>3</sub> treatments changed non significantly as compared to 13 d (Figure 55C and G). However, as compared to the WW:FA treatments, τ and λ values were 66% and 38% greater in Carpaccio, respectively, and 60% and 15% greater in Robusta, respectively (Figure 55C and G). SL<sub>max</sub> decreased by 56% in Carpaccio and by 47% in Robusta (Figure 55K).

Regarding stomatal opening, g<sub>1</sub> was not significantly affected by O<sub>3</sub> in either genotype (Table S2). Final steady states were similar under the WW:O<sub>3</sub> and WW:FA treatments, *i.e.*, around

340 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.  $\tau$  and  $\lambda$  non significantly decreased under O<sub>3</sub> treatment in both genotypes (Figure 55D and 2H). Stomatal opening tends to be faster in both genotypes under WW:O<sub>3</sub> (Figure 55L).

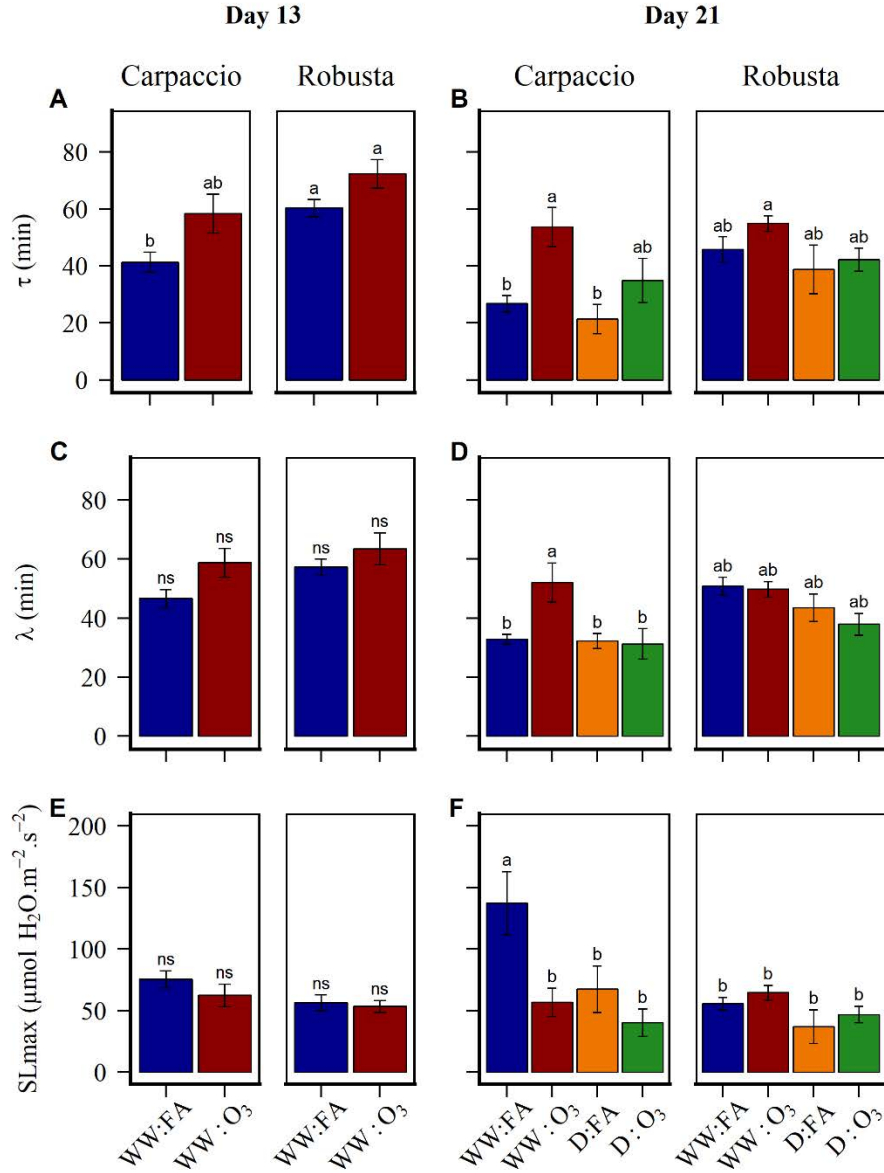


Figure 56 : Sigmoidal model parameters of stomatal dynamics in response to VPD changes in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes after 13 days (A, C, E) or 21 days (B, D, F) when submitted to 80 ppb of O<sub>3</sub> for 13 days and/or water deficit for an additional week. (A, B):  $\tau$ , response time(s); (C, D):  $\lambda$ , lag time(s); (E, F): SL<sub>max</sub>, maximum slope (mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-2</sup>). Means  $\pm$  se, n  $\geq$  4. Letters show the significance levels between genotype and treatments (p < 0.05); ns, not significant. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone. ANOVA, P-values are available in Table S4.

*V.2.3.2.b. Responses to VPD*

The study of the vapour pressure deficit response curves consisted in measuring stomatal closure under pressures ranging between 0.8 and 3 kPa. At the end of the O<sub>3</sub> treatment (13 d), the assimilation (A<sub>0</sub>) and stomatal conductance (g<sub>0</sub>) values of the initial steady states of Carpaccio and Robusta were almost the same as those of the light response curves (Tables S3 and S4). After stomatal closure, CO<sub>2</sub> assimilation (A<sub>1</sub>) decreased by 16 to 30% as compared to A<sub>0</sub> depending on genotype or treatment (Table S4). The  $\tau$  parameter in control conditions differed between genotypes (Figure 56A), as it took Robusta 19 min more than Carpaccio. O<sub>3</sub> increased  $\tau$  by 17 min and 11 min in Carpaccio and Robusta, respectively (Figure 56A). The  $\lambda$  parameter also differed between the two genotypes in the control conditions: it took Robusta saplings 11 min more to reach the inflection point (Figure 56C).  $\lambda$  increased under O<sub>3</sub> treatment in both genotypes, *i.e.*, by 12 min and 5 min in Carpaccio and Robusta, respectively (Figure 56C).

After a week without O<sub>3</sub> treatment, stomatal dynamic responses to VPD still showed a few differences between the control and the O<sub>3</sub> treatment. In Carpaccio, O<sub>3</sub> increased  $\tau$  and  $\lambda$  by 1.8 and 1.6 fold, respectively (Figure 56B and D). SL<sub>max</sub> decreased by 70% in Carpaccio (Figure 56F). Robusta was impacted in a different way, as  $\tau$  slightly increased by 1.1 fold under O<sub>3</sub> treatment, but  $\lambda$  was unaffected (Figure 56B and D).

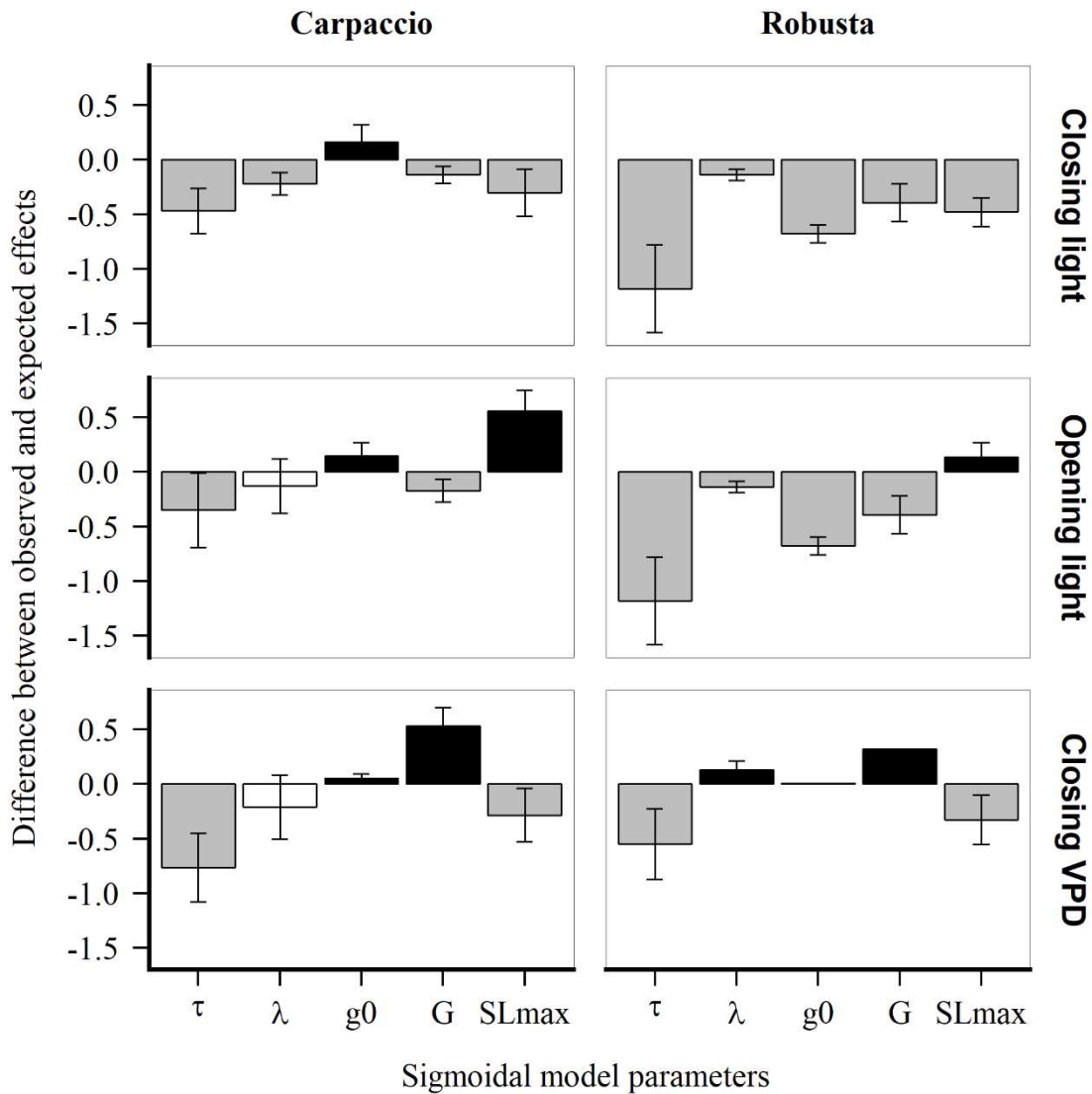


Figure 57 : Combined successive impacts of O<sub>3</sub> exposure and moderate water deficit on the parameters of the sigmoidal model for irradiance and VPD responses for the Carpaccio and Robusta genotypes.  $\tau$ , response time;  $\lambda$ , lag time, and  $SL_{max}$ , maximum slope;  $g_0$  and  $G$ , steady-state values of stomatal conductance at the beginning and the end of the experiment. Bars represent the mean difference ( $\pm$  95% confidence interval) between the observed and expected additive effects of the combined two stressors. The zero line represents the expected additive effects of the combined stressors. Additive effects are in white; when the means were greater or lower than zero, they were considered as synergistic (black) or antagonistic (grey), respectively. (Bansal et al., 2013).

### V.2.3.3. Effect of water deficit on stomatal behaviour

#### V.2.3.3.a. Response to irradiance

After 7 days of water deficit treatment, a significant water deficit effect was observed for some parameters of the model. Regarding stomatal closure under light, the initial steady state showed stomatal closure under water deficit conditions (Table S2). Water deficit induced

a 45% decrease of  $g_0$  in both genotypes (Table S2). After closure,  $g_1$  showed some marked differences with the control treatment, *i.e.*, an 84% decrease in Carpaccio and a 47% decrease in Robusta. Moreover, stomatal closure was greater in Carpaccio than in Robusta (88 vs. 122  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  for  $g_1$ , respectively). During the stomatal closure phase,  $\tau$  and  $\lambda$  were unaffected by water deficit in either genotype (Figure 55C and 2G).

During the stomatal opening phase due to irradiance, the water deficit effect was significant on  $\tau$  and  $SL_{\max}$  (Table S4).  $\tau$  decreased by 74% in Carpaccio but increased by 26% in Robusta as compared to the control (Figure 55D).  $\lambda$  was unaffected in Carpaccio but increased in Robusta (+ 21%) (Figure 55H).  $SL_{\max}$  increased under water deficit almost 3 times faster in Carpaccio (Figure 55L). These increases differed significantly between the genotypes (Table S4).

#### *V.2.3.3.b. Responses to VPD*

After the VPD closing phase,  $g_1$  were unaffected in Carpaccio, whereas it was 50  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  below the WW:FA values in Robusta (Table S4).  $A_0$  and  $A_1$  decreased under water deficit by the same amplitude (around 30%) in both genotypes (Table S4).

Water deficit affected the stomatal dynamics through a non significant decrease of the  $\tau$  parameter in both genotypes, by 20% in Carpaccio vs. 15% in Robusta (Figure 56B). The  $\lambda$  parameter was not modified in Carpaccio but decreased in Robusta (-13%) (Figure 56D). Finally, a lower  $SL_{\max}$  was observed: -51% and -33% in Carpaccio and Robusta, respectively, as compared to the control (Figure 56F).



### V.2.3.4. *Effects of O<sub>3</sub> and water deficit on stomatal behaviour*

#### V.2.3.4.a. *Responses to irradiance*

After 7 days of water deficit treatment, most of the parameters showed an antagonistic response in the combined treatment (Figure 57), except the initial steady state  $g_0$  in Carpaccio. In this genotype, stomatal closure was greater than under the water deficit treatment alone (Table S2). During stomatal closing under irradiance,  $\tau$  slightly increased by 6 min in Carpaccio, in-between the values under water deficit and O<sub>3</sub> exposure, and was unaffected in Robusta as compared to the control (Figure 55C).  $\lambda$  showed the same trends as under the D:FA modality (Figure 55G).  $SL_{max}$  was significantly affected by the water deficit x O<sub>3</sub> interaction ( $p=0.05$ ): in Carpaccio,  $SL_{max}$  was lower than under the D:FA and WW:O<sub>3</sub> modalities, by 23% as compared to the WW:FA modality. In Robusta,  $SL_{max}$  was in the same range as under D:FA conditions (Figure 55K). Stomatal opening as a result of irradiance under the combined treatment revealed no significant effect of the water deficit x O<sub>3</sub> interaction on any of the parameters of the models except  $\tau$  (Table S4). In Carpaccio,  $SL_{max}$  values were intermediate between D:FA and WW:O<sub>3</sub> values, almost twice the WW:FA value. In Robusta,  $SL_{max}$  tended to increase as compared to the other treatments (Figure 55L), resulting in a synergistic effect (Figure 57).

#### V.2.3.4.b. *Responses to VPD*

After 7 days of water deficit treatment on saplings previously submitted to O<sub>3</sub> treatment, no significant effect was observed (Table S4). There was a synergistic effect on  $G$  ( $g_1$ ), under the D:O<sub>3</sub> modality, the final steady state tended to be “more closed stomata” in Carpaccio vs. “slightly more open stomata” in Robusta than under the WW:O<sub>3</sub> or D:FA modalities (Table S4). Otherwise, most of the parameters showed an antagonistic effect (Figure 57). In Robusta, the  $\lambda$  parameter decreased (by 26% as compared to the control) under the combined treatments (Figure 56D), more than under water deficit or O<sub>3</sub> alone, resulting in a synergistic effect (Figure 57). In Carpaccio,  $SL_{max}$  decreased in a similar way under all three modalities. (Figure 56F).

## V.2.4. Discussion

### V.2.4.1. *Sluggish stomatal response to O<sub>3</sub>*

In our experiment, the first symptom of the daily exposure to 80 ppb O<sub>3</sub> was visible on  $g_s$ : after one week of exposure, both genotypes closed their stomata in response to O<sub>3</sub>. This stomatal closure was associated with decreased net CO<sub>2</sub> assimilation and chlorophyll contents. Impairment of gas exchanges under O<sub>3</sub> exposure is well documented (Wittig et al., 2007). The decrease in net CO<sub>2</sub> assimilation by the two poplar genotypes under O<sub>3</sub> exposure had been

mentioned previously and mainly linked to the modification of Rubisco activity and chlorophyll degradation (Dghim et al., 2013; Guidi et al., 2001). This impact on photosynthesis was clearly visible for each steady state at  $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  of PAR.

In addition, stomatal closure went along with decreased steady states. This stomatal response was reversible: when  $\text{O}_3$  exposure was interrupted, saplings rapidly recovered the same steady states as in the control treatment. According to the dynamics parameters in response to irradiance, the lag time ( $\lambda$ ) was not modified by  $\text{O}_3$  during stomatal closure, but a few constitutive differences between the genotypes were visible. In Robusta,  $\tau$  tended to increase under  $\text{O}_3$  exposure. The main effect for both genotypes was a trend toward a lower  $\text{SL}_{\text{max}}$ , *i.e.*, the so-called  $\text{O}_3$  sluggishness. In addition, steady states ( $g_1$ ) in the dark were slightly higher. This might have consequences under natural conditions, when  $\text{O}_3$  entrance during the night time could be significant (Hoshika et al., 2013) and could enhance water loss (Grulke et al., 2004). From our results, we can propose a hypothetical model of the stomatal daily course (Figure 58) in conditions of stable diurnal irradiance throughout the day, with maximum VPD at midday. This representation highlights the differences between treatments and genotypes and the potential impact on the  $\text{O}_3$  flux,  $\text{CO}_2$  assimilation (grey area), or used water (blue area). This theoretical representation was inspired by a hypothetical model of Dumont et al. (2013), the results of a Ball-Berry-type model from Tuzet et al. (2003), and daily conductance measurements from Durand et al. (2019). The differences in  $g_s$  values between treatments, genotypes, and irradiance variations were conserved. As for stomatal closure, the model parameters were also modified during stomatal opening.

The main atmospheric determinant of stomatal opening at midday is VPD (McAdam & Brodribb, 2015). Higher VPD differently affected stomatal behaviour among genotypes in the control. Firstly, the  $\lambda$  parameter differed between the genotypes; Robusta was less responsive to VPD and needed more time to reach the inflection point. This could be linked to constitutive differences between the genotypes. Previous works showed that Robusta stomata were less responsive to VPD variation (Dumont et al., 2013). These genotypic differences could be as determining as differences between species. Differences between species were taken into account in the  $\text{O}_3$  flux model (Hayes & Bangor, 2017). It is obvious that the genotypic specificity could also affect the calculation of the species-specific stomatal  $\text{O}_3$  flux; moreover,  $\text{O}_3$ -induced stomatal closure and sluggishness could affect water use efficiency and transpiration calculations (Dumont et al., 2013; Hoshika et al., 2015; Paoletti & Grulke, 2005). These effects could be of particular interest, as stomatal sluggishness was still present after  $\text{O}_3$  exposure and could be responsible for a greater water use in the middle and at the end of the

day (Figure 58). Interestingly, after O<sub>3</sub> exposure was stopped, Robusta recovered the same assimilation rate as the control whereas Carpaccio photosynthesis remained impaired. Our results are consistent with stomatal recovery after O<sub>3</sub>-induced stress observed in the literature. Similar recovery was reported in white clover (Francini et al., 2007). Nonetheless, this imperfect recovery due to carry-over or ‘memory’ effects could be particularly detrimental under repeated O<sub>3</sub> exposure (Oksanen, 2003; Oksanen & Saleem, 1999) combined with other biotic or abiotic stresses (Langebartels et al., 1998), *e.g.*, water deficit conditions. However, this ‘memory’ could also be responsible for a ‘conditioning’ mechanism through a hormetic response (Agathokleous et al., 2019) and/or cross-tolerance (Walter et al., 2013). In both cases, this effect could modify tree resilience and acclimation to a new disturbance.

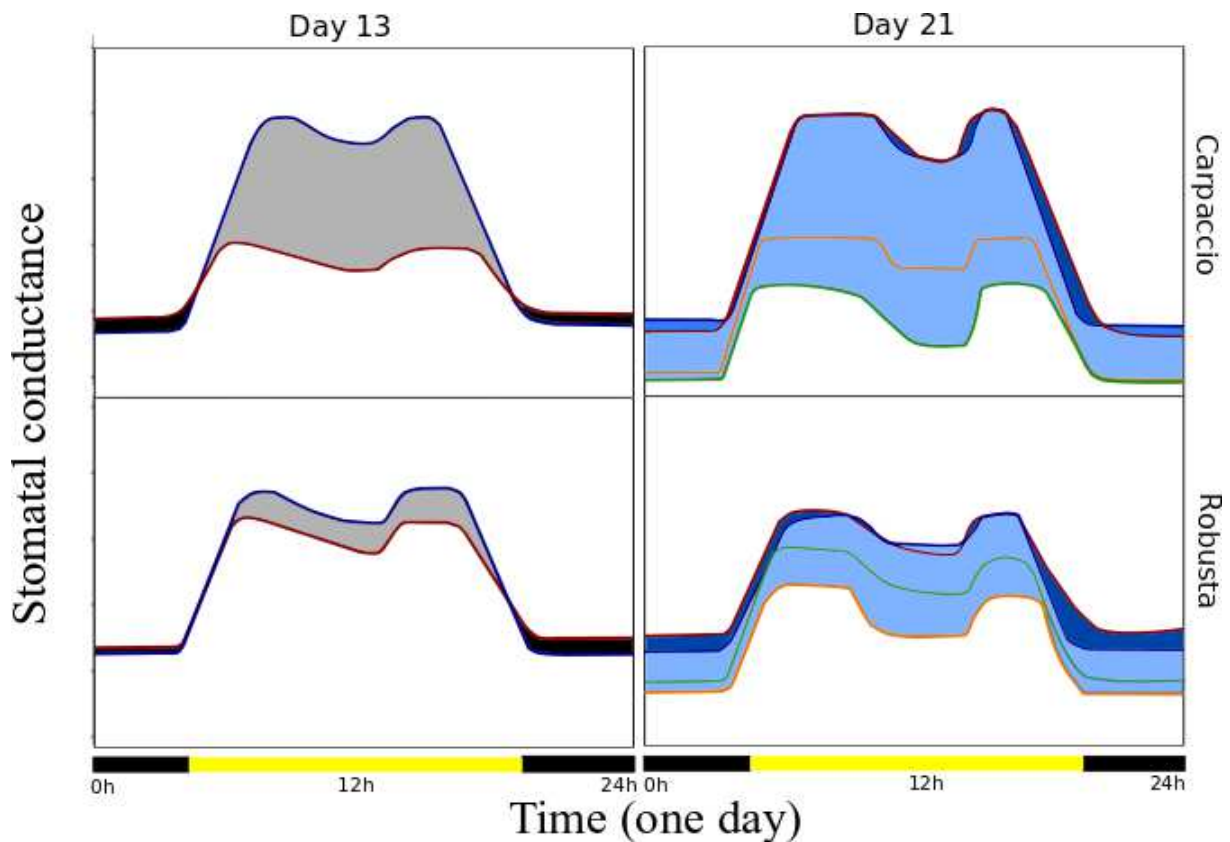


Figure 58 : Hypothetical stomatal daily courses in natural conditions for both genotypes after O<sub>3</sub> exposure (red line), water deficit treatment (green line), or the combined treatment (orange line). The O<sub>3</sub>-induced effect is represented on d 13, with a decreased O<sub>3</sub> uptake in the daytime as the main effect with decreased steady states (grey area), but with an increased O<sub>3</sub> uptake at night (black area). Water consumption is represented on d 21 (blue area). Blue, WW:FA; orange, D:FA; red, WW:O<sub>3</sub>; green, D:O<sub>3</sub>. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

#### V.2.4.2. *Water deficit induces slower stomatal closure in response to light and VPD*

Water deficit reduced only the total leaf surface of Carpaccio genotype (Table S1) associated with an expected stomatal closure over time (Bogeat-Triboulot et al., 2007; Chaves et al., 2002; Dusart et al., 2019b). In response to darkness, the time response parameters were modified, with a few differences between the genotypes. Nevertheless, the lag time and closing speed were not impacted by water deficit in either genotype. Interestingly, in the dark both genotypes had their stomata more closed than the control saplings. Moreover, Robusta stomata were less closed than Carpaccio stomata. This could result in differences in water loss at night (Figure 58) (Caird et al., 2007). By contrast, stomatal opening following irradiance affected all the parameters of the models. The opening speed increased in both genotypes, especially in Carpaccio. Faster stomatal opening under water deficit has been reported in *Phaseolus vulgaris* (Barradas et al., 1994). Water loss might increase due to faster stomatal opening, but may also increase the leaf carbon assimilation (Barradas et al., 1994). In response to VPD, water deficit affected stomatal dynamics through a decrease of the  $\tau$  parameter in both genotypes. The lag time parameter was not modified in Carpaccio and decreased in Robusta. There was great sluggishness in the response to VPD. Stomatal closure sluggishness in response to irradiance and/or VPD has been reported in different species, after leaf excision in *Populus trichocarpa x deltoides* (Reich & Lassoie, 1984), under soil water deficit conditions in *Phaseolus vulgaris* (Hoshika et al., 2013), *Nicotiana tabacum* (Gérardin et al., 2018), *Populus nigra*, and *Populus euramericana* (Durand et al., 2019a). Stomatal closure under soil water deficit or increased VPD was found closely related to ion transport and abscisic acid perception (McAdam & Brodribb, 2015; Pospíšilová, 2003). These mechanisms could be modified by O<sub>3</sub> through ABA synthesis (McAdam et al., 2017) or through other phytohormones such as ethylene (Wilkinson & Davies, 2010, 2009).

#### V.2.4.3. *Antagonistic effect of the successive exposure to O<sub>3</sub> and water deficit*

When O<sub>3</sub> exposure was followed by water deficit, we observed a combination of the effects of O<sub>3</sub> or water deficit alone. The impact on height and radial growth was similar to the effect of water deficit alone in both genotypes. Nevertheless, total biomass decreased more following the successive stresses (Table S1). As seen above, water deficit and O<sub>3</sub> separately modified stomatal behaviour in response to VPD or irradiance fluctuations. The interaction between the two stress factors may have modified stomatal responses (Hoshika et al., 2013; Wilkinson & Davies, 2009). Concerning gas exchanges, stomatal closure was observed in both genotypes, with a decreased steady state. Carpaccio stomata tended to be more closed than under O<sub>3</sub>

exposure or water deficit alone, whereas Robusta stomata were slightly less closed than under water deficit alone (Figure 58). Under the combined treatment, most of the parameters showed an antagonistic response, *i.e.*, a weaker response than the expected additive effect (Bansal et al., 2013; Dusart et al., 2019b; Pellegrini et al., 2019).  $\tau$  seemed to increase as compared to the control and drought treatment alone, but less than under O<sub>3</sub> exposure. The lag time and final steady state were modified in the same way as under water deficit alone. In Carpaccio, stomatal sluggishness increased as compared to the separate constraints, and this may have increased transpiration under water deficit. In Robusta, the slower closure was in the same range as under water deficit alone. Regarding stomatal opening due to irradiance, the response was the same as for water deficit alone on all the parameters of the models, without any significant interaction of O<sub>3</sub>. In response to VPD, most of the parameters showed an antagonistic effect, except a synergistic effect on the lag time for Robusta.  $\lambda$  parameters indeed decreased under the combined treatment, more than under water deficit or O<sub>3</sub> exposure alone, as compared to the control. This effect could result from a better detection of environmental variation. The different stomatal behaviours under successive stresses in the two genotypes could result in different water losses (Figure 58) at the leaf scale. Robusta may have lost more water during the day when exposed to the combined stress than to water deficit alone. These differences in leaf scale between genotypes could be particularly detrimental for a water-deficit sensitive genotype. Nevertheless, in order to model physiological processes, it is important to take constitutive differences in total leaf area between genotypes into account, as this difference could impact extrapolation at the whole tree scale.

#### **V.2.4.4. Consequences for modelling**

Modelling  $g_s$  is an important issue to use flux-based metrics for forest O<sub>3</sub> risk assessment (Fares et al., 2013). Scientific literature about  $g_s$  models at the leaf level is abundant (see Damour et al., 2010 for a review). Most current models used for O<sub>3</sub>, such as the DO<sub>3</sub>SE model (Emberson et al., 2000), are based on Jarvis multiplicative model (Jarvis, 1976) and do not take O<sub>3</sub>-induced stomatal sluggishness into account (Hayes & Bangor, 2017). Hoshika et al. (2017) proposed to take stomatal sluggishness into account through a single parameter ( $s$ ) and directly on steady states through an O<sub>3</sub> function ( $f_{O_3}$ ). The main competitor of the Jarvis-type model is based on the Ball-Woodrow-Berry model (BWB) (Ball et al., 1987). This model integrates a more physiological approach and considers the relationship between  $g_s$  and photosynthesis. Its modified version should be preferred for O<sub>3</sub>- induced decoupling between photosynthesis and stomatal conductance (Cailleret et al., 2018; Lombardozzi et al., 2012). Moreover, this model

requires adding a soil water function. Contrasting results have been found between the Jarvis or BWB models (Hoshika et al., 2017a). If these models are properly parameterised, they can both accurately predict  $g_s$  in complex ecosystems (Fares et al., 2013). This will depend on available data for model parameterisation and calibration (Fares et al., 2013), but could be crucial for studying O<sub>3</sub>-sensitive tree species. Moreover, our results highlight that it is important to take genotype-specific responses into account, *e.g.* Carpaccio stomata closed faster than Robusta stomata under VPD, and opened faster under irradiance. Nonetheless, these observations at the leaf scale might not be easily extrapolated at the tree scale because of multiple obstacles: i) scaling up from leaf to canopy is tricky (Ollinger et al., 1997; Zhou et al., 2017), ii) the impact of phenology, aging, and enhanced leaf senescence should be taken into account (Anav et al., 2018), iii) leaf stomatal density is modified in newly formed leaves (Durand et al., 2019a; Pääkkönen et al., 1997), iv) detoxification and repair processes occur (Tuzet et al., 2011), and v) conditioning (Agathokleous et al., 2019) or cross-tolerance processes (Tausz et al., 2007) occur too. All these points could challenge the implementation of larger models and the scaling up to whole tree or forest ecosystems.

### V.2.5. Conclusion

Despite constitutive differences between genotypes, O<sub>3</sub> and water deficit induced stomatal closure and closing sluggishness. 80 ppb O<sub>3</sub> exposure followed by water deficit modified stomatal closure differently between the two genotypes: Carpaccio stomata closed more than under water deficit alone, whereas Robusta stomata closed less than under water deficit alone. These modifications could have a non-negligible effect on O<sub>3</sub> uptake, carbon storage, and water use efficiency. The underlying mechanisms still need investigations into the active or passive physiological regulation induced by environmental fluctuations (irradiance, VPD, O<sub>3</sub>, soil water deficit, etc.). Previous studies suggested different stomatal closure/opening mechanisms, *i.e.*, i) passive hydric regulation of guard cells (Buckley & Mott, 2002), ii) mediation by a cross-talk between phytohormones (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013), with a particular implication of abscisic acid or ethylene (McAdam & Brodribb, 2015; Wilkinson & Davies, 2010, 2009), iii) O<sub>3</sub> and/or drought-induced stomatal closure through modification of guard cell homeostasis *via* direct modulation of K<sup>+</sup> channels (Geiger et al., 2009; Vahisalu et al., 2010), alteration of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolar antiporters (Dumont et al., 2014a), and production of reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Damour et al., 2010). Understanding these mechanisms and the cross-talks between the O<sub>3</sub> and water deficit responses (as successive stresses or in

combination) could allow for a better prediction of  $g_s$  in response to various environmental modifications.

## V.2.6. Supplementary data

### Methods 1

The method of Bansal et al., (2013) was used to determine if O<sub>3</sub> and water deficit had an additive, synergistic or antagonistic impact. On one hand, the expected additive effects were determined by adding the independent effects of O<sub>3</sub> alone (*i.e.*, the observed differences between WW:O<sub>3</sub> and WW:AF) and of water deficit alone (*i.e.*, the observed differences between D:AF and WW:AF) minus their product to avoid over-inflated response estimates (Darling et al., 2010). On the other hand, the observed effect for the D:O<sub>3</sub> treatment was determined from the differences between D:O<sub>3</sub> and WW:AF. The expected additive effects following separate treatments were compared to the observed combined effects. When the difference between the two effects was positive and the lower 95% confidence interval boundary was greater than zero, the impact of the combined stressors was classified as synergistic. Similarly, when the difference was negative and the upper 95% confidence interval boundary was below zero, the combined impact was classified as antagonistic.



Table S1: Impact of O<sub>3</sub> or/and water deficit on growth parameters of the Carpaccio and Robusta genotypes. Means ± se, n= 16. The significance of the factors or their interaction was tested by ANOVA. p-values ( $P \leq 0.05$ ) are in bold. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Genotype	Water treatment	Ozone treatment	Height growth (cm)		Radial growth (cm)		Number of leaves	Total surface (m <sup>2</sup> )	Leaves (g DW)	Stem (g DW)	Root (g DW)	Total biomass (g DW)	Root/shoot
			0d	21d	0d	21d							
Carpaccio	WW	FA	51.0 ± 1.3	121.8 ± 1.8	5.3 ± 0.2	9.2 ± 0.3	42 ± 1	0.51 ± 0.01	23.6 ± 0.6	15.8 ± 0.6	7.9 ± 0.4	47.2 ± 1.6	0.20 ± 0.01
		O <sub>3</sub>	51.7 ± 0.8	118.6 ± 2.7	5.3 ± 0.1	8.8 ± 0.2	42 ± 1	0.51 ± 0.01	23.5 ± 0.6	14.3 ± 0.4	6.9 ± 0.4	44.7 ± 1.2	0.18 ± 0.01
	D	FA	48.6 ± 1.0	117.7 ± 1.5	5.0 ± 0.1	8.8 ± 0.2	41 ± 1	0.46 ± 0.01	22.8 ± 0.6	14.8 ± 0.6	6.6 ± 0.4	44.2 ± 1.3	0.18 ± 0.01
		O <sub>3</sub>	52.2 ± 1.1	115.8 ± 1.9	5.3 ± 0.1	8.0 ± 0.2	38 ± 1	0.44 ± 0.01	21.2 ± 0.6	13.0 ± 0.4	6.0 ± 0.2	40.2 ± 1.6	0.18 ± 0.01
Robusta	WW	FA	55.1 ± 2.2	82.1 ± 0.7	6.7 ± 0.1	8.8 ± 0.1	40 ± 0	0.38 ± 0.01	24.1 ± 0.5	14.5 ± 0.4	18.9 ± 0.9	57.5 ± 1.1	0.50 ± 0.03
		O <sub>3</sub>	53.3 ± 1.3	80.0 ± 1.0	6.6 ± 0.2	8.6 ± 0.1	36 ± 1	0.39 ± 0.01	23.1 ± 0.5	13.6 ± 0.4	18.2 ± 1.3	55.0 ± 1.9	0.49 ± 0.03
	D	FA	53.2 ± 0.8	82.1 ± 1.7	6.9 ± 0.1	9.3 ± 0.1	36 ± 1	0.38 ± 0.01	24.6 ± 0.5	15.3 ± 0.4	16.3 ± 1.1	56.2 ± 1.2	0.41 ± 0.03
		O <sub>3</sub>	52.5 ± 1.2	81.8 ± 0.4	6.4 ± 0.2	8.5 ± 0.0	33 ± 1	0.37 ± 0.00	22.3 ± 0.5	13.6 ± 0.4	13.6 ± 0.8	49.5 ± 1.1	0.38 ± 0.03
Genotype			0.037	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	0.144	<b>0.007</b>	<b>&lt;.001</b>	0.550	<b>0.049</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>
O <sub>3</sub>			0.663	0.180	0.980	0.122	0.543	0.966	0.911	<b>0.028</b>	0.448	0.202	0.619
WD			0.180	0.086	0.266	0.125	0.299	<b>&lt;.001</b>	0.306	0.129	0.576	0.123	0.481
Genotype x O <sub>3</sub>			0.361	0.736	0.873	0.619	<b>0.034</b>	0.895	0.468	0.482	0.403	0.990	0.760
Genotype x WD			0.855	0.234	0.217	<b>0.033</b>	0.100	0.025	0.256	<b>0.048</b>	0.406	0.527	0.151
O <sub>3</sub> x WD			0.248	0.705	0.466	0.344	0.096	0.221	0.202	0.751	0.86	0.611	0.750
Genotype x O <sub>3</sub> x WD			0.606	0.897	0.254	0.757	0.240	0.882	0.922	0.652	0.582	0.485	0.509

Table S2: Stomatal closure/opening in response to irradiance. Gas exchanges steady state measurements for irradiance sigmoidal model response for the two Carpaccio and Robusta poplar genotypes submitted to 80 ppb of O<sub>3</sub> for 13 days and/or moderate water deficit for 7 days. g<sub>0</sub>, steady state before stomatal closure (PAR: 800 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>); g<sub>1</sub>, steady state after closure before opening; g<sub>2</sub>, steady state after opening (mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>); A<sub>0</sub> assimilation (μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) before closing (PAR: 800 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), A<sub>1</sub> assimilation after closing and before opening in the dark (PAR: 0 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), A<sub>2</sub> assimilation after opening (PAR: 800 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Water use efficiency (A/g) was calculated for open stomata. Means ± se, n ≥ 4. The significance of the factors or their interaction was tested by ANOVA. p-values (P ≤ 0.05) are in bold. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Days	Genotype	Water treatment	Ozone treatment	g <sub>0</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
13	Carpaccio	WW	FA	469 ± 29	88 ± 10	436 ± 19	19.63 ± 0.23	-1.33 ± 0.03	18.81 ± 0.22
			O <sub>3</sub>	245 ± 22	107 ± 11	207 ± 20	7.94 ± 1.13	-1.72 ± 0.09	11.18 ± 0.45
	Robusta	WW	FA	370 ± 33	123 ± 8	375 ± 13	19.29 ± 0.78	-1.60 ± 0.07	19.74 ± 0.48
			O <sub>3</sub>	486 ± 25	143 ± 10	326 ± 20	15.05 ± 0.52	-1.88 ± 0.06	13.80 ± 0.33
Genotype			<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.131	<b>0.001</b>	<b>0.020</b>	<b>0.001</b>	
O <sub>3</sub>			0.086	0.068	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	
Genotype x O <sub>3</sub>			0.383	0.986	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	0.540	0.104	
21	Carpaccio	WW	FA	458 ± 53	95 ± 38	415 ± 43	14.36 ± 1.78	-1.16 ± 0.06	12.23 ± 2.14
		D	FA	267 ± 43	16 ± 4	223 ± 33	14.15 ± 0.49	-1.23 ± 0.11	13.15 ± 0.63
		WW	O <sub>3</sub>	439 ± 35	75 ± 14	339 ± 28	15.34 ± 0.53	-1.14 ± 0.07	12.85 ± 0.83
		D	O <sub>3</sub>	181 ± 22	12 ± 4	155 ± 15	11.78 ± 0.47	-1.07 ± 0.06	10.88 ± 0.68
	Robusta	WW	FA	380 ± 28	134 ± 12	337 ± 22	17.78 ± 0.62	-1.42 ± 0.09	17.44 ± 0.67
		D	FA	211 ± 14	71 ± 7	234 ± 26	14.97 ± 0.80	-1.62 ± 0.09	14.35 ± 0.49
		WW	O <sub>3</sub>	494 ± 36	161 ± 13	338 ± 12	14.36 ± 0.41	-1.28 ± 0.09	14.92 ± 0.50
		D	O <sub>3</sub>	352 ± 49	87 ± 12	290 ± 30	13.68 ± 0.57	-1.65 ± 0.12	12.82 ± 0.55
Genotype			<b>&lt;.001</b>	0.399	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>0.006</b>	<b>&lt;.001</b>	
O <sub>3</sub>			0.687	0.275	0.684	0.061	0.091	0.104	
WD			<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	<b>&lt;.001</b>	0.490	0.123	0.397	
Genotype x O <sub>3</sub>			0.189	<b>0.014</b>	0.174	0.099	0.258	0.098	
Genotype x WD			0.940	<b>0.006</b>	0.912	0.759	0.508	0.848	
O <sub>3</sub> x WD			0.848	0.422	0.925	0.100	0.602	0.928	
Genotype x O <sub>3</sub> x WD			0.597	0.542	0.564	<b>0.035</b>	0.288	0.363	

Table S3: ANOVA P-values of the effects of ozone (O<sub>3</sub>), water deficit, and genotype on  $\tau$ ,  $\lambda$  and SL<sub>max</sub> on d 13 (the end of O<sub>3</sub> fumigation) and d 21 (the end of the experiment). Asterisks indicate the significance of the factors or their interactions tested by a linear mixed-effect model: ‘\*\*\*\*’P ≤ 0.001, ‘\*\*\*’P ≤ 0.01, ‘\*\*’P ≤ 0.05, ‘ns’ non-significant.

Days		Closing irradiance			Opening irradiance			Closing VPD		
		$\tau$	$\lambda$	SL <sub>max</sub>	$\tau$	$\lambda$	SL <sub>max</sub>	$\tau$	$\lambda$	SL <sub>max</sub>
13	Genotype	0.009 **	0.955 ns	0.234 ns	0.392 ns	0.319 ns	0.348 ns	0.002 **	<.001 ***	0.051 ns
	O <sub>3</sub>	0.204 ns	0.148 ns	0.026 *	0.663 ns	0.69 ns	0.963 ns	0.005 **	0.022 *	0.261 ns
	Genotype x Ozone	0.465 ns	0.046 *	0.811 ns	0.15 ns	0.619 ns	0.038 *	0.613 ns	<.001 ***	0.474 ns
21	Genotype	0.053 ns	0.131 ns	0.343 ns	0.005 **	0.061 ns	<.001 ***	0.009 **	0.105 ns	0.03 *
	O <sub>3</sub>	0.002 *	<.001 ***	<.001 ***	0.038 *	0.787 ns	0.959 ns	0.003 **	<.001 ***	0.046 *
	Water deficit	0.025 *	0.023 *	0.025 *	0.258 ns	0.002 **	0.007 **	0.011 *	<.001 ***	0.007 **
	Genotype x O <sub>3</sub>	0.633 ns	0.196 ns	0.849 ns	0.025 *	0.255 ns	0.651 ns	0.094 ns	0.424 ns	0.006 **
	Genotype x Water deficit	0.797 ns	0.182 ns	0.151 ns	0.221 ns	0.312 ns	0.074 ns	0.789 ns	0.302 ns	0.253 ns
	O <sub>3</sub> x Water deficit	0.037 *	0.028 *	0.014 *	0.277 ns	0.645 ns	0.487 ns	0.248 ns	0.558 ns	0.217 ns
	Genotype x O <sub>3</sub> x Water deficit	0.864 ns	0.979 ns	0.447 ns	0.036 *	0.719 ns	0.472 ns	0.64 ns	0.223 ns	0.23 ns

Table S4: Stomatal closure in response to VPD. Gas exchanges steady state measurements of the vapour pressure deficit (VPD) sigmoidal model response for the two Carpaccio and Robusta poplar genotypes submitted to 80 ppb of O<sub>3</sub> for 13 days and/or moderate water deficit for 7 days. g<sub>0</sub>, steady state before stomatal closure; g<sub>1</sub>, steady state after stomatal closure (mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>); A<sub>0</sub>, assimilation before closure, A<sub>1</sub> assimilation after closure (μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), A<sub>2</sub>, assimilation before opening. Water use efficiency (A/g) was calculated for both steady states. Means ± se, n ≥ 4. The significance of the factors/interaction test by ANOVA (P ≤ 0.05) is in bold. FA: filtered air; WW, well-watered; D, water deficit; O<sub>3</sub>, ozone.

Days	Genotype	Water treatment	Ozone treatment	g <sub>0</sub>	g <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>
13	Carpaccio	WW	FA	448 ± 27	182 ± 20	18.52 ± 0.49	15.51 ± 0.53
			O <sub>3</sub>	262 ± 22	104 ± 17	12.15 ± 0.23	8.04 ± 1.00
	Robusta	WW	FA	406 ± 33	138 ± 12	20.26 ± 0.60	14.54 ± 0.81
			O <sub>3</sub>	537 ± 25	160 ± 15	13.85 ± 0.84	11.10 ± 0.43
Genotype				<.001	0.716	<b>0.004</b>	0.167
O <sub>3</sub>				0.393	0.11	<.001	<.001
Genotype x O <sub>3</sub>				<.001	<b>0.005</b>	0.977	0.01
21	Carpaccio	WW	FA	546 ± 64	122 ± 17	21,48 ± 3.46	12,66 ± 0.85
		D	FA	407 ± 53	123 ± 15	12,73 ± 0.36	9,50 ± 0.86
		WW	O <sub>3</sub>	182 ± 34	79 ± 12	16,42 ± 1.31	10,05 ± 1.37
		D	O <sub>3</sub>	207 ± 35	68 ± 6	10,04 ± 1.99	7,71 ± 0.38
	Robusta	WW	FA	323 ± 26	163 ± 8	17,66 ± 0.59	14,81 ± 0.34
		D	FA	487 ± 36	114 ± 25	12,45 ± 1.62	9,68 ± 1.07
		WW	O <sub>3</sub>	167 ± 10	102 ± 4	17,38 ± 4.11	11,37 ± 0.95
		D	O <sub>3</sub>	319 ± 24	124 ± 6	17,90 ± 6.49	10,82 ± 0.42
Genotype				0.684	<b>0.011</b>	0.342	<b>0.016</b>
O <sub>3</sub>				0.090	0.383	0.086	<.001
WD				<.001	<b>0.001</b>	0.880	<b>0.017</b>
Genotype x O <sub>3</sub>				<.001	0.658	0.119	0.943
Genotype x WD				<b>0.045</b>	0.266	0.069	0.436
O <sub>3</sub> x WD				0.201	0.160	0.189	<b>0.050</b>
Genotype x O <sub>3</sub> x WD				0.139	<b>0.050</b>	0.422	0.166

### V.3. Implication de l'ascorbate et du glutathion

Lors de l'expérimentation exposant les plants à l'O<sub>3</sub> puis à une sécheresse modérée, un dosage de l'ascorbate et du glutathion par méthode HPLC a été réalisé à deux dates :

- À la fin du traitement O<sub>3</sub> : 13<sup>e</sup> jour
- À la fin d'une période de déficit hydrique de 7 jours : 21<sup>e</sup> jour

#### V.3.1. Résultats

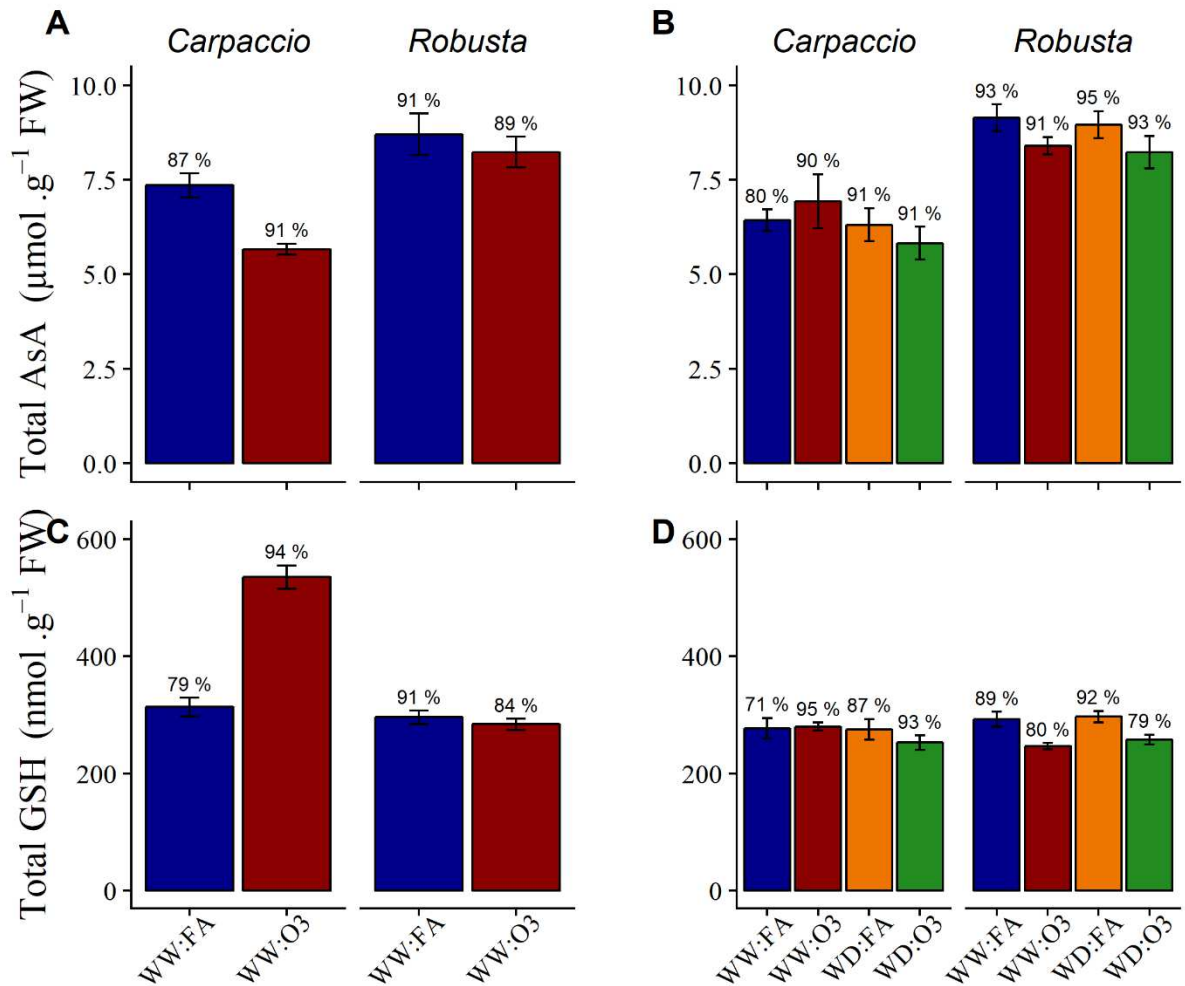


Figure 59 : Quantification du contenu total en ascorbate (A et B) en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière fraîche (FW), et du contenu total en glutathion (GSH) (C et D), exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière fraîche (FW), dans les feuilles de Carpaccio et Robusta exposées à l'O<sub>3</sub> pendant 13 jours, puis à un déficit hydrique avec un retour en condition air filtré. WW:FA (contrôle) : bleu, D:FA (déficit hydrique et air filtré) : orange; WW:O<sub>3</sub> (bien hydraté et ozone) : rouge; D:O<sub>3</sub> (déficit hydrique et ozone) : vert. Moyenne (n = 8)  $\pm$  erreur standard. Les pourcentages correspondent au niveau de réduction.

Tableau 14 : Effet du génotype, du traitement O<sub>3</sub>, du déficit hydrique (WD) et de leur interaction à 14 et 21 jours sur le contenu en ascorbate total (Total AsA), en glutathion total (Total GSH) et sur le pourcentage de réduction des deux métabolites. La significativité de l'ANOVA de type II à 2 ou 3 facteurs est représentée en gras (p>0.05).

Days		Total AsA	% AsA reduced	Total GSH	% GSH form
14	Genotype	< <b>0.001</b>	0.832	< <b>0.001</b>	0.873
	O <sub>3</sub>	<b>0.005</b>	0.680	< <b>0.001</b>	0.368
	Genotype x O <sub>3</sub>	0.110	0.428	< <b>0.001</b>	0.064
21	Genotype	< <b>0.001</b>	0.161	0.747	0.637
	O <sub>3</sub>	0.184	0.717	<b>0.002</b>	0.797
	WD	0.192	0.287	0.720	0.278
	Genotype x O <sub>3</sub>	0.229	0.337	0.064	<b>0.001</b>
	Genotype x WD	0.467	0.580	0.195	0.418
	O <sub>3</sub> x WD	0.431	0.497	0.625	0.192
	Genotype x O <sub>3</sub> x WD	0.402	0.507	0.344	0.321

En condition contrôle, les deux génotypes montrent des différences de contenu en AsA. Robusta présente les niveaux les plus élevés, à 9  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW contre 7  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW pour Carpaccio. Les teneurs sont relativement stables en condition contrôle entre les deux temps de mesure (Figure 59, A et B). Quant au glutathion, les teneurs sont équivalentes entre les deux génotypes et stables entre les deux temps de mesure (Figure 59, C et D).

Après 14 jours de fumigation à l'O<sub>3</sub>, l'ANOVA révèle un effet significatif de l'O<sub>3</sub> sur les teneurs en AsA total, mais pas d'effet sur le pourcentage de réduction (Tableau 14). La tendance est à la diminution pour les deux génotypes. Le plus marqué est Carpaccio, à 5,6  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW contre 7  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  FW en condition contrôle (Figure 59, A). Par ailleurs, le contenu en glutathion est impacté par l'O<sub>3</sub> seulement pour Carpaccio. En effet, le contenu en GSH total double sous O<sub>3</sub> pour ce même génotype (Figure 59, C).

Après 21 jours de traitement, le retour en condition contrôle ou la sécheresse ne modifie pas les teneurs en AsA (Figure 59, B et Tableau 14). Pour Carpaccio, le niveau de glutathion des arbres soumis à l'O<sub>3</sub> retourne au même niveau que le contrôle. Néanmoins, le pourcentage de réduction du glutathion est plus élevé comparé à celui du contrôle (+ 24 %) (Figure 59, D). Pour Robusta, les teneurs totales en AsA et GSH tendent à être plus faibles pour les arbres soumis à l'O<sub>3</sub> (non significatif) (Figure 59, B et D). De plus, le pourcentage de réduction du glutathion est plus faible de 10 % dans les traitements ayant reçu de l'O<sub>3</sub> (Figure 59, D).

### V.3.2. Discussion

Cette expérimentation a permis de vérifier l'utilisation de l'HPLC pour la détermination des contenus en AsA et GSH chez le peuplier. En effet, les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que les résultats précédemment présentés lors de la première expérimentation à 120 ppb (Dusart et al., 2019b). Cependant, la méthode par HPLC semble plus précise (réduction de la variance) et plus facilement reproductible. La fumigation d'O<sub>3</sub> à 80 ppb pendant 13 jours induit un doublement du contenu en GSH pour le génotype Carpaccio. Cette augmentation ne semble pas liée à un flux entrant équivalent entre 11 jours à 120 ppb et 13 jours à 80 ppb. En effet, lors de l'expérimentation à 120 ppb présentée dans le chapitre 4, Carpaccio révèle un doublement du contenu en GSH pour un POD<sub>0</sub> de 15 mmol.m<sup>-2</sup> après 11 jour d'O<sub>3</sub>. Lors de cette expérimentation à 80 ppb, le POD<sub>0</sub> était de 9.7 mmol.m<sup>-2</sup> après 13 jour d'O<sub>3</sub>. Il est néanmoins délicat de comparer la dose d'O<sub>3</sub> entrante entre les deux expérimentations, notamment à cause de différences d'âge et de sélection de la feuille. Lors de cette expérimentation à 80 ppb pour compenser les différences d'éclairement de la feuille suivie entre les deux génotypes, le génotype Carpaccio a été exposé à l'O<sub>3</sub> après 5 semaines de culture contre 6 semaines pour Robusta. Il en résulte une différence de maturation de la feuille, notamment visible sur les teneurs en anthocyanes (Figure 60). Cet aspect sera discuté plus en détails dans le Chapitre VI : Discussion générale.

Pour Robusta, ni les teneurs en AsA et en GSH ni leur statut redox ne sont impactés par la fumigation à 80 ppb d'O<sub>3</sub>. Robusta semble être capable de maintenir la régénération des deux antioxydants via les enzymes du cycle HAF.

À la fin des 21 jours d'expérimentation, le déficit hydrique ne modifie pas les pools d'antioxydants foliaires pour aucun des génotypes. Ce résultat est cohérent avec l'expérimentation publiée dans Dusart et al. (2019b). En effet, si les pools foliaires d'AsA et GSH ne sont pas modifiés par nos conditions expérimentales de déficit hydrique, alors que la littérature rapporte des modifications des augmentations d'AsA et GSH (Laxa et al., 2019; Wujeska et al., 2013), nous l'avons expliqué par des conditions d'éclairement des chambres de cultures insuffisantes pour induire un important stress photo-oxydant associé au déficit hydrique.

Les 7 jours de récupération après l'O<sub>3</sub> entraînent un retour au niveau de base des teneurs des deux métabolites pour les deux génotypes. Néanmoins, pour le génotype Carpaccio, les pourcentages de réduction pour l'AsA et le GSH tendent à être plus élevés. Cette observation pourrait être le résultat d'un conditionnement à l'O<sub>3</sub>, qui entraînerait une meilleure réponse dans

le cas d'une nouvelle période d'exposition (Agathokleous et al., 2019). À l'opposé, pour Robusta, le pourcentage de réduction des deux métabolites tend à diminuer. Ces modifications de l'équilibre redox pourraient être responsables de modifications de la physiologie de la feuille à plus long terme.

L'exposition successive à l'O<sub>3</sub> et à un déficit hydrique ne semble pas affecter différemment les pools d'AsA et GSH. En l'absence d'informations plus complètes concernant le cycle HAF, notamment concernant les activités enzymatiques, il faut rester prudent quant à un possible effet combiné. Dans nos conditions expérimentales, l'arrêt de l'O<sub>3</sub> semble permettre une récupération des deux peupliers, qu'ils soient ensuite soumis à la sécheresse ou non. Dans des conditions naturelles, où l'O<sub>3</sub> et le déficit hydrique pourraient être associés à un stress photo-oxydant fort, l'impact pourrait être délétère.

De plus amples recherches sont donc nécessaires pour mieux appréhender l'impact que peut avoir la succession de contraintes sur la plante et la résilience de celle-ci face aux stress, notamment sur les modifications de l'équilibre redox, l'impact sur la signalisation phytohormonale et, par conséquent, sur le « cross-talk » responsable des mécanismes de régulation du fonctionnement des stomates.



### V.3.3. Figures supplémentaires

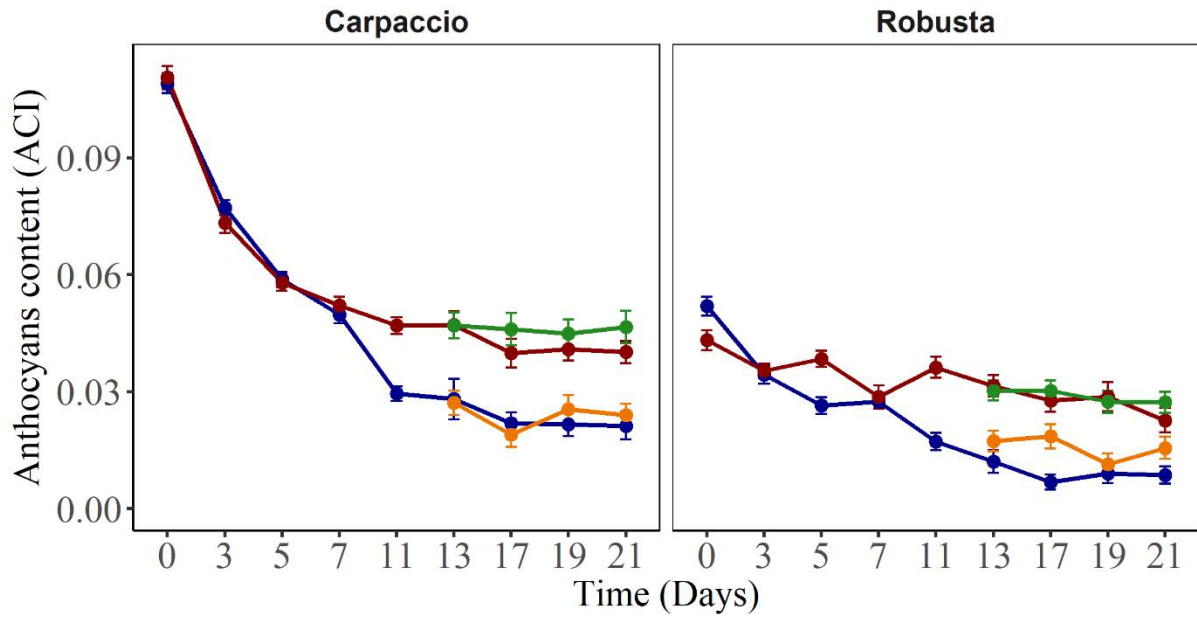


Figure 60 : Cinétique de réponse de des teneurs en anthocyane chez Carpaccio et Robusta soumis à l'O<sub>3</sub> puis au déficit hydrique. Moyenne  $\pm$  se, n= 4. WW:FA (contrôle) : bleu, D:FA (déficit hydrique et air filtré) : orange; WW:O<sub>3</sub> (bien hydraté et ozone) : rouge; D:O<sub>3</sub> (ozone puis déficit hydrique) : vert. L'unité est celle du dualex (Anthocyan content index, ACI).

## **Chapitre VI. Discussion générale**

---

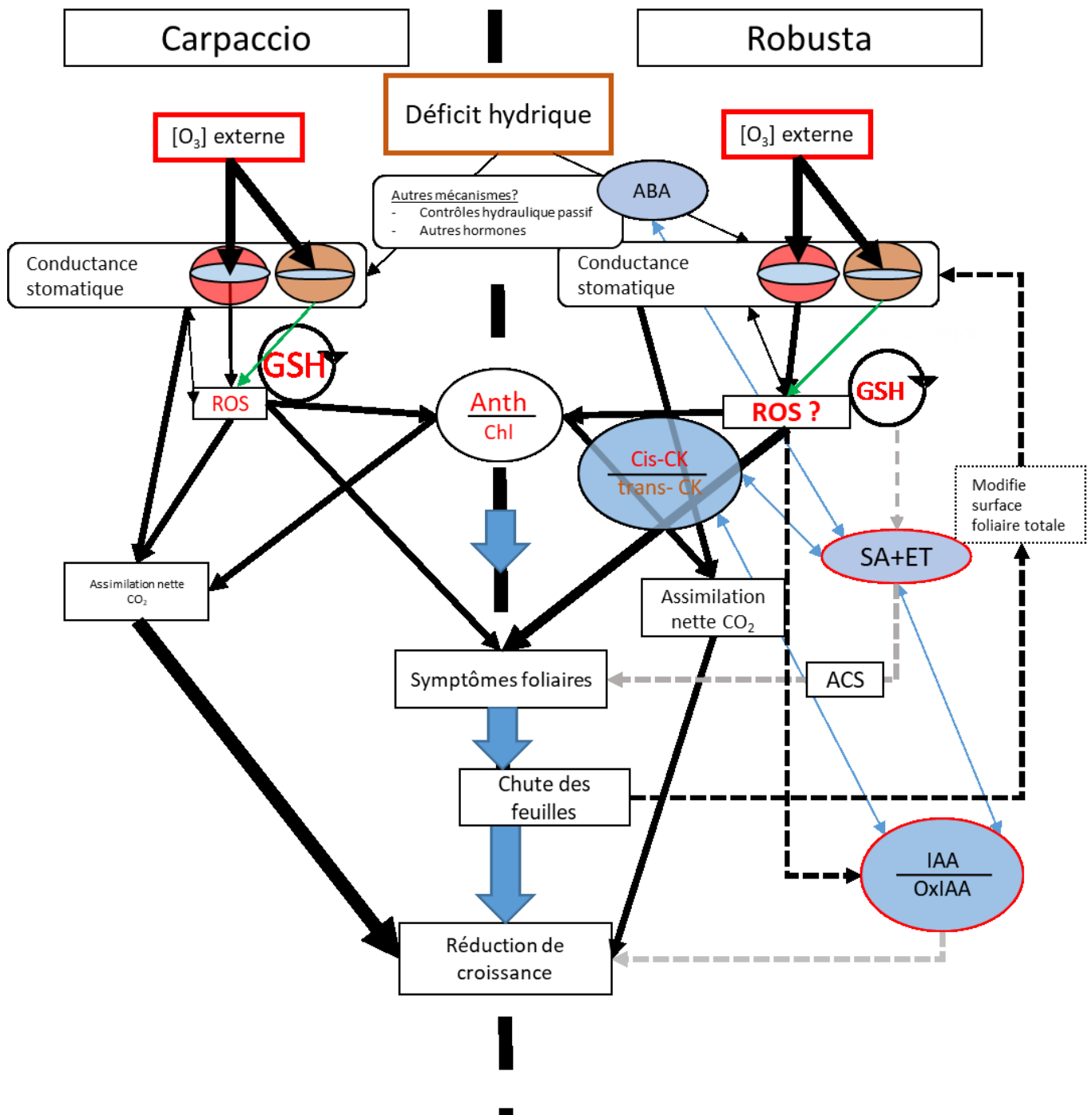


Figure 61 : Bilan schématique de la différence de réponse des deux génotypes de peupliers Carpaccio et Robusta soumis à l'O<sub>3</sub> et ou au déficit hydrique. La taille des flèches illustre la force relative de l'effet. Les flèches pointillées symbolisent les relations supposées entre hormones, détoxification et les paramètres suivis par rapport à la littérature. Les flèches bleues en double sens entre hormones représentent les antagonismes possibles entre ces molécules selon la littérature. Traitements : O<sub>3</sub> en rouge, déficit hydrique en marron, la combinaison des deux en vert. ACS, accelerated cell senescence.

## **VI.1. Différence génotype-spécifique : deux stratégies de réponse à l'O<sub>3</sub>**

La réponse à l'O<sub>3</sub> chez les deux génotypes de peupliers n'est pas binaire. En effet, il n'y a pas de dichotomie stricte opposant un génotype tolérant à un autre plus sensible. Ce serait opérer une simplification superficielle que de considérer qu'il existe d'un côté un arbre tolérant, c'est-à-dire ne présentant pas de symptômes et se développant de manière totalement indifférente à la présence d'O<sub>3</sub>, et de l'autre un génotype sensible, souffrant de symptômes graves dus à son exposition au gaz. La réalité est plus complexe, puisque les mécanismes de réponse mis en place par chaque génotype sont eux-mêmes composés d'une multitude d'interactions à différents niveaux de la plante. La tolérance, si elle est observée, est relative. En effet, les deux génotypes sur lesquels nous avons expérimenté sont tous les deux sensibles à l'O<sub>3</sub>, dans le sens où il nous a été possible de quantifier certains symptômes liés à la présence du facteur de stress : symptômes foliaires, chute de feuilles, modifications des échanges gazeux et du statut redox (Figure 61).

### **VI.1.1. Contrôle de l'ouverture/fermeture des stomates**

A l'issue des travaux menés dans le cadre de précédentes thèses au sein du laboratoire, Carpaccio a été qualifié de génotype tolérant à l'O<sub>3</sub>, notamment parce que sa réponse se caractérise par une fermeture rapide et importante des stomates (Dumont, 2013). A l'inverse, Robusta a été considéré comme un génotype sensible en raison de la chute plus importante de feuilles et de l'apparition de nécroses sur les plus âgées lors d'une exposition à 120 ppb (Dghim, 2012). En revanche, la différence de réduction de la biomasse de la tige entre un traitement à 120 ppb et un autre à l'air filtré n'est pas significative entre les deux génotypes. Cette constatation nous a conduit à interroger à nouveau la différence prédéfinie entre les deux génotypes et, par voie de conséquence, la question de la tolérance/sensibilité d'un arbre à l'O<sub>3</sub>. L'objectif principal était alors le suivant : *comment évaluer la sensibilité/tolérance à l'O<sub>3</sub> des deux génotypes de peupliers étudiés, Carpaccio et Robusta ?* Pour tenter de répondre à cette question, nous avons réitéré la comparaison des deux génotypes exposés à 120 ppb, mais également à d'autres concentrations (80, 150 et 200 ppb) en prenant en compte leur réponse au flux d'O<sub>3</sub> entrant lors de l'exposition. Afin de comprendre la réponse de chaque génotype et éventuellement pouvoir les classer en fonction de leur sensibilité respective, il est cependant nécessaire de considérer un ensemble de paramètres intégrés à l'échelle du plant. Sur le plan de la croissance, tout d'abord, les différentes expérimentations montrent que, lors d'une exposition à une dose d'O<sub>3</sub> chronique de durée relativement courte, la croissance en hauteur des deux

généotypes de peupliers juvéniles n'est pas affectée tandis que la croissance radiale diminue. Il en résulte une tendance à la diminution de la biomasse de la tige. Toutefois, en raison de l'existence de disparités entre les expérimentations, ce critère seul ne permet pas de différencier les deux génotypes. En effet, à 120 ppb, Carpaccio montre une réduction de biomasse de 10% tandis que Robusta n'est pas affecté (Dumont et al., 2013) ou bien, aucune différence entre les génotypes n'est observée (Dusart et al., 2019b). Lors de l'expérimentation de succession de stress à 80 ppb, l'exposition à l'O<sub>3</sub> a réduit la biomasse de la tige sans différence significative entre les deux génotypes. Lors de la comparaison à différentes doses d'O<sub>3</sub>, la biomasse tend à diminuer avec l'augmentation des concentrations d'O<sub>3</sub> sans différence significative entre les deux génotypes et cela malgré des différences dans la chute des feuilles. En effet, la conséquence majeure et clairement visible d'une exposition au gaz concerne bien la biomasse foliaire. La chute des feuilles nécrosées est alors observée et témoigne d'une certaine sensibilité des deux génotypes. En considérant ce paramètre seul, Robusta peut effectivement apparaître plus sensible à l'O<sub>3</sub> que Carpaccio. Cependant, la chute des feuilles est loin d'être un critère permettant une caractérisation définitive de la différence de sensibilité entre les deux génotypes. En effet, non seulement ce paramètre varie en fonction de la concentration d'O<sub>3</sub> à laquelle les plants sont exposés, mais il dépend également de la stratégie de réponse du génotype. En effet, la diminution de la surface foliaire totale induite par la perte des feuilles a pour conséquence la réduction des échanges plante-atmosphère, et donc du flux d'O<sub>3</sub> à l'échelle de l'arbre entier. Bien que néfaste pour la plante, la réduction du feuillage peut en réalité faire partie d'une stratégie d'évitement, d'autant plus dans le cas de jeunes plants, qui pourront compenser les pertes par la production de nouvelles feuilles (Kolb et al., 1997). La chute des feuilles doit donc être considérée à la fois comme un symptôme et faisant partie de la réponse de la plante au stress.

Pour tenter de comprendre ce qui caractérise la tolérance ou la sensibilité des génotypes à l'O<sub>3</sub>, il est donc nécessaire d'étudier d'autres paramètres, et notamment les deux barrières de défense contre le gaz phytotoxique, à savoir le contrôle du flux d'O<sub>3</sub> par les stomates et la détoxification cellulaire, correspondant à la gestion des ROS produits en réponse à l'entrée du gaz dans la plante.

Sur le premier point, nos résultats montrent l'existence de modifications des échanges gazeux chez les deux génotypes (Figure 61). En effet, sous O<sub>3</sub>, la conductance stomatique diminue, et ce, de manière plus importante à mesure que les concentrations du gaz augmentent. Dans le cas de Carpaccio, la fermeture des stomates est proportionnelle à la concentration d'O<sub>3</sub>, tandis que

pour Robusta, celle-ci est moins marquée, bien que présente (Chapitre III). La différence entre les deux génotypes tient à l'effet de l'O<sub>3</sub> sur l'ouverture des stomates lors d'une exposition à la lumière. En effet, pour Carpaccio, le gaz ralentit l'ouverture des stomates, limitant certes les entrées d'O<sub>3</sub> et les pertes d'eau, mais au détriment de la photosynthèse. A l'inverse, l'O<sub>3</sub> accélère l'ouverture des stomates chez Robusta, permettant au gaz d'entrer en plus grande quantité, mais également de maximiser l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Nous pouvons donc en déduire que, en réponse au flux d'O<sub>3</sub>, deux stratégies s'affrontent au niveau des échanges gazeux : Carpaccio met en place une forte stratégie d'évitement quand Robusta tend à maintenir une meilleure assimilation. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, à POD<sub>0</sub> égal, Robusta maintient mieux son assimilation nette de CO<sub>2</sub> que Carpaccio. Selon les résultats obtenus à 80 ppb, il convient également de préciser que, après un retour à la normale, la conductance stomatique revient au niveau du traitement contrôle, et ce, pour les deux génotypes. Ce résultat tend à confirmer l'hypothèse d'un contrôle actif des stomates en réponse au stress, plutôt que celle d'une altération des mécanismes de fermeture des stomates, comme cela a pu être suggéré dans la littérature, lors d'expérimentations sur d'autres espèces non ligneuses (Mills et al., 2009).

Par ailleurs, la première barrière de défense que sont les stomates n'étant pas régulée de la même façon, le flux d'O<sub>3</sub> entrant est, de fait, différent d'un génotype à l'autre. Cependant, des différences de valeurs absolues de g<sub>s</sub> et d'initiation de la réponse de fermeture ont été observées d'une expérimentation à l'autre, pour un même génotype. En effet, lors de l'expérimentation à 120 ppb présentée dans le Chapitre IV, Carpaccio est plus tardif que Robusta pour enclencher la fermeture de ses stomates sous O<sub>3</sub>. Un décalage de 7 jours est d'ailleurs observé entre les deux génotypes dans la mise en place du mécanisme de fermeture des stomates. Il en résulte une différence de POD<sub>0</sub> importante entre les feuilles suivies chez les deux génotypes. Lors d'une expérimentation précédente à 120 ppb, Robusta montre bien des valeurs de conductance plus élevées et une fermeture des stomates plus précoce de trois jours par rapport à Carpaccio (Dumont et al., 2014a). Lors de l'expérimentation à 80 ppb (Chapitre V), Robusta ferme également ses stomates plus précocement, la fermeture est visible dès 3 jours de fumigation, contre 10 jours pour Carpaccio. De plus, la conductance de Robusta était légèrement plus élevée. Il en résulte un POD<sub>0</sub> plus élevé pour Robusta que pour Carpaccio. Enfin, lors de l'expérimentation à différentes doses d'O<sub>3</sub> présentée dans le Chapitre III, la conductance est en moyenne la même entre les deux génotypes (0,35 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) lors de l'initiation du stress et l'effet des traitements O<sub>3</sub> est simultané, avec une réponse de fermeture des stomates dès 4 jours (plus marqué chez Carpaccio). Ces différences au niveau des échanges gazeux observées entre les génotypes et entre les expérimentations peuvent être expliquées par au moins trois facteurs :

- La position de la feuille diffère en raison de la différence de taille entre les génotypes. C'est le cas pour l'expérimentation à 120 ppb présentée dans le Chapitre IV. Cela conduit à des différences d'éclairement des feuilles suivies et impacte les échanges gazeux. A cela, il faut ajouter un phénomène d'ombrage potentiellement différent d'un génotype à l'autre. C'est pour limiter ces impacts que nous avons décaler la croissance de Carpaccio et Robusta d'une semaine pour l'expérimentation présentée dans le Chapitre V ou que nous avons surélevé les arbres lors de l'expérimentation à différentes doses présentée dans le Chapitre III.
- L'âge de la feuille sélectionnée peut différer entre les génotypes et selon l'expérimentation. En effet, le choix de la feuille pleinement étendue est en partie subjectif. Une variabilité de plus ou moins deux feuilles et plus ou moins deux jours dans la sélection de celle-ci a pu impacter les échanges gazeux.
- La maturation de la feuille se révèle différente entre les deux génotypes. Ce point sera développé plus loin (cf VI.1.3), mais, par exemple, dans l'expérimentation 3 à 80 ppb d'O<sub>3</sub> présentée dans le Chapitre V, les plants Carpaccio étaient 1 semaine plus jeune que les plants Robusta afin de compenser l'effet taille. Il est possible que les feuilles sélectionnées pleinement étendues n'aient pas été au même stade de développement.

Ces différences de conductance stomatique impactent le flux d'O<sub>3</sub> entrant à l'échelle de la feuille. Cela signifie que, théoriquement, les feuilles suivies sur les deux génotypes ne sont pas soumises au même stress oxydant et que la deuxième voie de défense, représentée par les mécanismes de détoxification et de réparation cellulaires, peut s'exprimer différemment entre les feuilles de Carpaccio et celles de Robusta.

### **VI.1.2. Des différences de détoxification ?**

En réalité, nos résultats nous permettent de comprendre que si l'induction des défenses semble être fortement corrélée au flux d'O<sub>3</sub> entrant, ces défenses antioxydantes sont surtout similaires d'un génotype à l'autre. En effet, lors de l'exposition des plants à différentes doses d'O<sub>3</sub>, l'évolution des pigments antioxydants, anthocyanes et flavonols, a pu être corrélée au POD<sub>0</sub>, et ce indépendamment du génotype. De même, nos résultats confirment l'implication du cycle HAF en tant que mécanisme de défense de chaque génotype en réponse à l'O<sub>3</sub>. Dès 80 ppb d'O<sub>3</sub>, le contenu en AsA total tend à diminuer significativement pour les deux génotypes (Chapitre V). A 120 ppb, les teneurs en AsA ne sont cependant pas significativement impactées ni chez Carpaccio ni chez Robusta (Chapitre IV). Cette différence pourrait s'expliquer par le changement de méthode utilisée, la technique HPLC étant plus précise, et par la différence de

taille d'échantillonnage (n=4 à 120 ppb contre n=8 à 80 ppb). Néanmoins, la régénération de l'AsA, indépendante du GSH, par la MDHAR semble jouer un rôle majeur pour le maintien du statut redox. Par ailleurs, chez Carpaccio, en accord avec les résultats de Dumont et al. (2014), la biosynthèse de GSH est fortement augmentée par l'O<sub>3</sub> et semble proportionnelle au flux entrant. Tandis que chez Robusta, la modification des teneurs dépend de la concentration d'O<sub>3</sub> : à 80 ppb, aucune modification n'est visible, alors que le pool de GSH augmente à 120 ppb. Néanmoins, pour les deux génotypes, l'expérimentation à 120 ppb a montré que l'activité de la GR augmente et, donc avec elle, la régénération du GSH. Cette augmentation d'activité est associée à l'augmentation de l'expression des transcrits codant pour l'isoforme de GR et supposée localisée dans le cytosol. Ces modifications transcriptionnelles sont plus précoces pour Robusta que pour Carpaccio. La GR est l'enzyme clé impliquée dans la régénération du GSH. Ces résultats confirment le rôle majeur du glutathion dans la réponse au stress oxydant. De plus, le glutathion est impliqué dans de nombreux autres mécanismes enzymatiques, à travers notamment des glutathione peroxidase (GPX), des Glutathione S-Transferase (GST) avec une activité peroxidase et des glutaredoxines (GRX) liées aux péroxiredoxines (PRX) (Jacquot et al., 2013; Rahantaniaina et al., 2013). L'étude de ces familles d'enzymes en réponse à l'O<sub>3</sub> pourrait permettre de mieux comprendre et compléter les mécanismes de défenses antioxydantes. La deuxième barrière de défense de la plante, que constituent les mécanismes de détoxification et de réparation cellulaires, se déclenche donc aussi bien chez Carpaccio que Robusta en réaction au stress oxydant, bien que dans des proportions différentes, conséquence de l'action de la première barrière de défense, les stomates. L'étude de la détoxification cellulaire ne nous permet alors pas de définir absolument la tolérance ou la sensibilité au stress de chaque génotype.

En revanche, nos résultats nous permettent d'identifier des stratégies de réponse à l'O<sub>3</sub> différentes en fonction des génotypes. Ainsi, Carpaccio évite le stress en limitant l'entrée d'O<sub>3</sub> grâce à une meilleure fermeture des stomates (Chapitre III et Chapitre V). Ce mécanisme d'évitement est couplé à un système de détoxification dépendant de la dose de gaz entrante et s'appuyant fortement sur le glutathion. A l'inverse, Robusta tolère un flux d'O<sub>3</sub> plus important, ce qui lui permet de maximiser l'assimilation de CO<sub>2</sub>. Malgré la mise en place de mécanismes de détoxification (cycle HAF et flavonols), les feuilles les plus âgées subissent néanmoins davantage de dégâts dus à l'O<sub>3</sub>, ce qui donne lieu à une sénescence accélérée et à la chute plus importante des feuilles, participant ainsi à l'évitement du stress. La sénescence cellulaire accélérée pourrait être le résultat de l'activation des voies de l'acide salicylique et de l'éthylène (Figure 61). Etablir un lien plus clair entre déséquilibre redox et l'activation des voies de



signalisation hormonale permettrait de mieux comprendre les mécanismes de réponse des plantes. Enfin, l'étude de l'allocation des ressources azotées et carbonées pourrait permettre d'établir si la chute des feuilles est également couplée avec une réallocation des ressources efficace vers les feuilles jeunes. Une étude couplée intégrant la compréhension des mécanismes de signalisation hormonale et l'allocation des ressources pourrait permettre de mieux catégoriser les différentes plantes.

### **VI.1.3. Une réflexion à l'échelle du plant**

Au-delà des stratégies de réponse, nos résultats nous apprennent que, pour espérer identifier la tolérance ou la sensibilité d'un arbre à un stress, il est nécessaire de prendre en compte le plant dans sa globalité et d'étudier tous les paramètres en interaction, à tous les niveaux. En effet, ce qui apparaît comme le symptôme d'une sensibilité aigüe à un stress au niveau foliaire peut en réalité se révéler n'être que le fruit d'une stratégie de réponse plus complexe pour le plant. Ainsi, à l'échelle de la feuille, Carpaccio semble être le génotype le plus tolérant. Pourtant, à l'échelle du plant entier, rien ne permet d'affirmer avec certitude quel génotype est le plus sensible, puisque les deux montrent à la fois des symptômes du stress et une tolérance relative. Il apparaît que l'analyse d'une feuille seule est insuffisante, car cela revient à restreindre l'interprétation à des modifications qui peuvent interagir avec l'âge de la feuille, la position sur l'arbre et l'éclairement reçu. Or, la réponse de l'arbre dépend d'interactions multiples et complexes à différents niveaux. Ainsi, dans l'analyse de la réponse au stress, même à se limiter à l'échelle de la feuille, il faut *a minima* prendre également en compte le développement global de la plante, et donc les différences de développement foliaire et de croissance qui existent entre les deux génotypes. Ainsi, pour des plants de même âge, Carpaccio et Robusta n'ont pas la même surface foliaire et donc pas la même entrée d'O<sub>3</sub> à concentrations égales. En effet, c'est la surface foliaire totale qui définit les échanges avec l'environnement. Par ailleurs, l'évolution de cette surface à travers la chute de feuilles ou les modifications morphologiques des nouvelles feuilles, telles que l'épaississement ou la variation de densité stomatique (Pääkkönen et al., 1997), fait partie du mécanisme de réponse de la plante au stress. Dans le cadre de nos expérimentations, nous avons constaté qu'un décalage de la réponse de fermeture des stomates avait pu être observé, Robusta fermant plus précocement ses stomates à l'O<sub>3</sub> (chapitre IV et V). Pour Carpaccio, la réponse est plus tardive et la fermeture plus importante (chapitre IV et V). Néanmoins, lors de l'expérimentation à différentes doses d'O<sub>3</sub>, avec les plants Robusta surélevés pour que ses feuilles reçoivent le même éclairement que celles de Carpaccio, la réponse était d'une durée relativement égale entre les deux génotypes, à savoir environ 4 jours

de fumigation avant l'initiation de la fermeture, celle-ci étant plus forte pour Carpaccio. Cela pourrait s'expliquer par une différence de développement de la feuille étudiée. En effet, des travaux montrent que l'apparition des symptômes dépend du stade de maturité de la feuille (Bagard et al., 2008; Reich et al., 1985). Les modifications de réponse auraient alors lieu lors du passage puits/source, durant le développement foliaire (Bagard, 2008). Ces différences de développement des feuilles peuvent être en partie dues à la différence de croissance spécifique entre les deux génotypes. Carpaccio étant plus rapide pour croître, la production de nouvelles feuilles est également plus rapide. La maturation de celles-ci, cependant, pourrait être plus lente. L'observation de l'évolution des teneurs en chlorophylles et anthocyanes semble aller dans ce sens. En effet, lors des différentes expérimentations effectuées, les niveaux de chlorophylles ont toujours été plus faibles chez Carpaccio que chez Robusta. Bien que cette différence soit génotype-spécifique, il existe un réel décalage de maturation : l'augmentation des chlorophylles est plus précoce chez Robusta que chez Carpaccio. Parallèlement à cela, un décalage dans la diminution des anthocyanes a été observé entre les deux génotypes (Figure 60, supplément chapitre V). De plus, le profil des échanges gazeux chez les plants témoins est un argument supplémentaire en ce sens. En effet, en fonction de l'expérimentation, et donc de la feuille sélectionnée, le profil d'échanges gazeux diffère et montre des signes de la maturation de la feuille pleinement étendue sélectionnée au cours du temps. Cette observation complique en partie la relation entre symptômes et flux d' $O_3$  entrant. L'impact de l'âge de la feuille pourrait expliquer les disparités observées entre les différentes expérimentations de ma thèse et des thèses précédentes du laboratoire. Le décalage de développement des feuilles sélectionnées entre les génotypes résulte en des réponses légèrement différentes au niveau de la conductance, la fermeture plus ou moins précoce d'un génotype en fonction de l'âge de la feuille impactant fortement le  $POD_0$ . Il en résulte des comparaisons entre feuilles exposées à un flux d' $O_3$  différent. Par ailleurs, le gaz lui-même perturbe le développement de la feuille et accélère la sénescence (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Cette dernière action de l' $O_3$  en particulier, dépendante de sa concentration, pourrait permettre d'apporter des éléments de compréhension supplémentaire sur les modifications physiologiques observées. Un indice, bien que partiel, est d'ailleurs apporté par l'étude des phytohormones chez Robusta. En effet, l'induction sous  $O_3$  d'éthylène et d'acide salicylique liée à la sénescence et au vieillissement accéléré semble aller en ce sens. L'étude des phytohormones sous  $O_3$  est donc un axe de recherche intéressant, mais qui nécessite de plus amples travaux pour comprendre les mécanismes qui lient le changement de statut redox induit par le stress oxydant et la mise en place de la sénescence accélérée.

Il serait également intéressant d'aller plus loin sur le sujet du développement de la surface foliaire et d'étudier en détail les modifications structurales des nouvelles feuilles leur permettant de faire face à l'O<sub>3</sub>. De la même manière, on pourrait s'interroger sur la survie de ces mécanismes de défense : comment perdurent-ils après une exposition à l'O<sub>3</sub> ? Existe-t-il un effet « mémoire » ?

Enfin, en plus de considérer le plant dans son ensemble, avec ses complexités et spécificités, il reste également deux aspects à prendre en compte pour approfondir les stratégies de réponse face aux stress oxydants causés par l'O<sub>3</sub>, et ainsi évaluer la tolérance/sensibilité des arbres : la durée d'exposition et l'intensité du stress. En effet, les deux stratégies n'auront pas la même efficacité en réponse à un stress aigu court ou chronique long. La stratégie d'évitement qui repose sur la fermeture des stomates, telle qu'elle est mise en place par Carpaccio, peut être très efficace lors de l'exposition à des concentrations élevées d'O<sub>3</sub> sur des temps courts. En revanche, sur une durée plus longue, la limitation de l'assimilation du carbone pourrait impacter fortement la croissance et les mécanismes de défense antioxydants. Dans le cas de Robusta, cependant, l'exposition à une dose chronique d'O<sub>3</sub> sur un temps long permet le maintien de l'assimilation. Couplé à une bonne allocation des ressources, cela pourrait permettre de maintenir une certaine croissance. Exposé à des concentrations élevées sur temps court, néanmoins, les dégâts causés sur les feuilles les plus âgées pourraient ralentir un retour à la normale. Pour envisager de définir la tolérance relative d'un arbre à un stress, il est donc nécessaire de prendre en compte à la fois l'intensité du stress via le flux d'O<sub>3</sub> entrant et la durée d'exposition à ce stress. En effet, la mise en place des défenses et leur maintien en réponse à la contrainte s'inscrivent dans le temps.

## **VI.2. Tolérance relative au déficit hydrique**

Dans nos conditions expérimentales, le déficit hydrique du sol ralentit la croissance des deux génotypes. De plus, ces derniers répondent à la sécheresse par une fermeture efficace des stomates, sans effet sur l'assimilation, donc avec une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau, le ratio  $A_n$  sur  $g_s$  augmente (Chapitre IV et Chapitre V). Pour les deux génotypes, les mécanismes mis en place sont fortement liés à l'évitement du déficit hydrique via un contrôle efficace de la conductance stomatique (Figure 61). Néanmoins, cette fermeture des stomates tend à ralentir, notamment en réponse au VPD (Chapitre V). Cependant, comme les stomates sont plus fermés, les pertes en eau associées au ralentissement sont moins importantes qu'en condition contrôle. Par ailleurs, le déficit hydrique accélère l'ouverture des stomates en réponse à la lumière. En condition naturelle, ce mécanisme pourrait permettre d'optimiser l'assimilation

de CO<sub>2</sub> lors des premières heures du jour. L'ensemble de ces mécanismes de contrôle du stomate implique une maîtrise précise des transporteurs d'ions et l'intervention des phytohormones, notamment l'ABA (Pessaraki, 2018). Ainsi, les teneurs en ABA ont fortement augmenté chez *Robusta* lors de l'initiation du déficit hydrique (Chapitre IV). Ces modifications sont très probablement liées à la perception du déficit hydrique par les racines (Pospíšilová et al., 2005). En effet, l'ABA peut activer la fermeture des stomates via une signalisation en cascade (McAdam & Brodribb, 2015; Pessaraki, 2018). Une analyse du transcriptome foliaire, voire stomatique, serait d'ailleurs pertinente et pourrait améliorer notre compréhension de ces mécanismes en réponse au stress biotique. Néanmoins, le retour des teneurs foliaires en ABA au même niveau physiologique que le contrôle suggère que le maintien de la fermeture des stomates sur le long terme implique d'autres mécanismes (Chapitre IV). Ces derniers pourraient être liés à un réarrangement métabolique, à d'autres hormones (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013) et/ou à une régulation hydrique passive (Brodribb & McAdam, 2011). Par ailleurs, d'autres réarrangements physiologiques ont lieu dans la feuille, notamment via les trans-zéatines qui pourraient probablement être associées à la protection et à un retardement de la sénescence de la feuille (Gajdošová et al., 2011). Le rôle des CKs en réponse au stress nécessite également des études supplémentaires. En effet, des résultats obtenus sur des plants de tabac modifiés pour surexprimer l'isopentyl transferase (IPT) révèlent une amélioration de la tolérance au déficit hydrique via un ralentissement de la sénescence foliaire et le maintien des capacités antioxydantes (Rivero et al., 2007). Mieux comprendre le rôle des CKs dans la réponse au stress hydrique permettrait d'identifier des stratégies de protection de la feuille, et donc de discriminer des génotypes ayant des stratégies plus ou moins efficaces.

En réponse au déficit hydrique du sol, nos conditions ne semblent pas produire de stress oxydant au niveau foliaire ou, du moins, pas de manière comparable à celui engendré par l'O<sub>3</sub>. Il est très probable que les modifications du cycle HAF, étudiées à l'échelle de la feuille, masquent une réponse plus localisée, puisque les sources majeures de ROS lors d'un déficit hydrique sont dans les chloroplastes (Noctor et al., 2014). La présence importante d'AsA et de GSH dans ces mêmes chloroplastes (Zechmann, 2017, 2014) pourrait être suffisante pour contenir le stress oxydant induit par l'éclairement dans nos chambres de culture.

Enfin, il faut convenir que le déficit hydrique modéré au niveau du sol obtenu en conditions contrôlées est très différent des conditions de sécheresse en milieu naturel. En effet, en condition naturelle, le déficit hydrique dans le sol peut être associé à un fort VPD atmosphérique, un éclairement important, des températures élevées et, bien sûr, des

concentrations non négligeables d'O<sub>3</sub> troposphérique. Dans ces conditions, comme pour les chênes cultivés sur le dispositif O<sub>3</sub>-FACE en Italie, la production de ROS est induite chez les trois espèces de chênes et des mécanismes de défense (augmentation des composés phénoliques et des antioxydants lipophiliques) sont mis en place. La réponse des arbres en conditions naturelles dépend donc de la combinaison de nombreux facteurs de stress qui doivent être pris en compte dans l'interprétation des données.

### **VI.3. Combinaison de l'O<sub>3</sub> et de la sécheresse : un effet majoritairement antagoniste**

Tout d'abord, il convient de noter qu'il existe des différences de réponse aux deux contraintes prises séparément. Concernant les échanges gazeux, l'O<sub>3</sub> est responsable d'une fermeture partielle des stomates et d'une diminution de la photosynthèse, tandis que le déficit hydrique mène à une fermeture des stomates plus importante, mais sans impact sur la photosynthèse dans nos conditions. Par ailleurs, le stress oxydant résultant des deux contraintes semble différent : l'O<sub>3</sub> influence fortement le cycle ascorbate-glutathion alors qu'aucune modification majeure n'est observée sous déficit hydrique. Pour la réponse hormonale chez Robusta, le profil est différent entre O<sub>3</sub> et déficit hydrique. L'ABA est induite seulement sous déficit hydrique tandis que l'ET et le SA le seront plutôt sous O<sub>3</sub>. Par ailleurs, les cis- et trans-CKs sont stimulées différemment en réponse aux deux contraintes environnementales.

Dès lors, deux questions émergent : *quel impact ces différences peuvent-elles avoir lors de la combinaison simultanée de contraintes ? Les deux stress ont-ils un effet synergique ou antagoniste sur le peuplier ?*

Nous avons mis en évidence que, de la combinaison simultanée de l'O<sub>3</sub> et de la sécheresse, il résulte principalement un effet antagoniste sur les paramètres foliaires. La sécheresse joue en effet un rôle protecteur en limitant le flux d'O<sub>3</sub> entrant. Néanmoins, à l'échelle du plant, l'impact indépendant des deux contraintes est additif : il en résulte un ralentissement de la croissance dû au déficit hydrique du sol, associé à l'induction d'une sénescence accélérée par l'O<sub>3</sub> –minorée par rapport à l'O<sub>3</sub> seul, car dépendant de la dose entrante.

En effet, en réponse à la combinaison de stress, la plupart des paramètres étudiés impliqués dans le cycle HAF montrent des niveaux intermédiaires d'activités ou d'expression comparés à l'effet de chaque facteur de stress seul. Cette observation est grandement liée à la fermeture des stomates sous sécheresse, limitant ainsi le POD<sub>0</sub>. Nos résultats confirment donc les hypothèses déjà avancées concernant le contrôle de l'effet de l'O<sub>3</sub> par la sécheresse via la limitation du flux (Matyssek et al., 2006; Pääkkönen et al., 1998). Chez le peuplier, l'effet d'atténuation de la

réponse induite sous combinaison avait été montré sur le métabolisme primaire (Bohler et al., 2013). L'approche hormonale apporte toutefois d'autres éléments. Nos résultats montrent en effet un profil proche des effets de l'O<sub>3</sub> seul (e.g. DPA, oxIAA, cis-CK), mais présentant des spécificités liées au déficit hydrique (e.g. ABA, trans-CK). Cette modulation pourrait engendrer un « *cross-talk* » différent sous traitements combinés, dont le résultat pourrait induire une différence dans le déclenchement de la sénescence accélérée et de la mort cellulaire (Cotrozzi et al., 2017a). La modulation différentielle des phytohormones en réponse aux deux contraintes modifie probablement de manière complexe les interactions entre les différentes voies hormonales.

L'étude du chêne en conditions extérieures apporte d'ailleurs des éléments de réflexion supplémentaires en ce sens. La comparaison des traitements demande une modification de la prise en compte du traitement contrôle (bien hydraté et air ambiant), qui correspond, en extérieur, à un traitement O<sub>3</sub> ambiant. En effet, dans ces conditions, et contrairement à nos chambres de culture où l'air est filtré (avec des concentrations nulles en O<sub>3</sub>), les arbres contrôles sont exposés à l'O<sub>3</sub> (air ambiant). Les plants soumis à la sécheresse dans le cadre du dispositif O<sub>3</sub>-FACE peuvent alors être en réalité exposés à des niveaux d'O<sub>3</sub> inférieurs aux contrôles, résultats d'une fermeture des stomates plus importante. Bien que l'expérimentation n'ait pas été prévue pour étudier la réponse aux flux d'O<sub>3</sub>, nous avons constaté que ce sont les arbres soumis au déficit hydrique le plus fort qui présentent le moins d'effets de l'O<sub>3</sub> (section IV.3.3). Comme pour nos expérimentations sur le peuplier, les résultats révèlent un effet majoritairement antagoniste des deux contraintes combinées pour la majeure partie des paramètres biochimiques étudiés. Cependant, au niveau de la biomasse, un déficit hydrique sévère combiné à l'O<sub>3</sub> donne lieu à un effet synergique (Hoshika et al., 2018). Par ailleurs, bien que le déficit hydrique exerce un effet protecteur de l'O<sub>3</sub> en limitant le flux entrant par la fermeture des stomates, les défenses mises en place contre le gaz ne semblent pas modifier la réponse au déficit hydrique. D'ailleurs une expérimentation sur le chêne *Q.cerris*, tolérant à l'O<sub>3</sub> mais pas à la sécheresse, semble indiquer que les mécanismes de protection sous O<sub>3</sub> ne sont pas utiles en réponse au déficit hydrique du sol (Cotrozzi et al., 2017b). Par contre, l'étude identifie un « *cross-talk* » possible entre différents métabolites, sucres, phytohormones et antioxydants conduisant à la sénescence accélérée. L'idée est que le déficit hydrique protège de l'O<sub>3</sub>, mais le gaz phytotoxique ne protège pas du déficit hydrique. Seuls ou en combinaison, les deux stress réduisent le gain en carbone et modifient la capacité de puits de carbone des arbres (Matyssek et al., 2006). De la même manière que si l'on considérait les deux contraintes séparées, l'intensité et la durée de la combinaison des deux facteurs sont deux éléments

primordiaux de compréhension de la réponse de l'arbre à prendre en compte. Encore une fois, la réponse mise en place au cours du temps par l'arbre va être déterminante. Il a en effet été montré que l'exposition à une sécheresse sévère peut affaiblir l'arbre et modifier sa réponse à l'O<sub>3</sub> (Pollastrini et al., 2014). En raison de l'observation d'un phénomène de pic d'O<sub>3</sub> printanier suivi de sécheresses estivales, nous nous sommes intéressés à la question inverse : *comment un épisode de pollution O<sub>3</sub> peut-il modifier la réponse de la plante à une sécheresse ultérieure ? Dans quelle mesure les mécanismes de défense mis en place pour contrer l'O<sub>3</sub> peuvent-ils avoir un effet bénéfique sous sécheresse ou, inversement, comment la plante peut-elle gérer les dégâts dus à l'O<sub>3</sub> sous sécheresse ?*

Lors de l'expérimentation visant à reproduire la succession de contraintes, nos résultats montrent que l'exposition préalable à l'O<sub>3</sub> modifie légèrement la réponse à la sécheresse. L'effet du déficit hydrique prédomine, sans qu'il y ait addition de l'effet de l'O<sub>3</sub> seul. L'ouverture des stomates en réponse à la lumière est la même en combinaison qu'en traitement déficit hydrique seul pour les deux génotypes. Néanmoins, Carpaccio montre un ralentissement de la fermeture des stomates en réponse à la lumière ou au VPD plus important, ce qui pourrait augmenter la transpiration. La différence la plus marquante concerne l'amplitude d'ouverture/fermeture des stomates qui varie entre les deux génotypes. Pour Carpaccio, la conductance stomatique diminue et tend à être plus faible pour l'étude du traitement successif comparé au déficit hydrique seul. A l'inverse, les stomates de Robusta sont moins fermés en réponse à la succession. Il ne faut néanmoins pas écarter que les stratégies mises en place sous O<sub>3</sub> peuvent modifier la réponse au déficit hydrique, notamment l'impact de la chute des feuilles sur la transpiration à l'échelle de la plante entière. En effet, les feuilles tombées lors de l'exposition à l'O<sub>3</sub> peuvent ralentir l'installation du déficit hydrique en permettant une économie d'eau à l'échelle de l'arbre. Cette expérimentation a également permis de montrer la résilience des processus physiologiques foliaires. Après le retour à la normale, les échanges gazeux retournent effectivement au niveau du traitement contrôle pour les deux génotypes. C'est également le cas pour les teneurs en AsA et GSH, qui retournent au même niveau que le traitement air filtré sans impact du déficit hydrique. Des analyses supplémentaires sont toutefois nécessaires pour comprendre l'évolution de la détoxification cellulaire au cours du temps. Réaliser un profil de l'activité enzymatique et transcriptionnelle permettrait ainsi d'obtenir une meilleure vue d'ensemble. Enfin, l'étude de l'alternance répétée des conditions air filtré et exposition à l'O<sub>3</sub> pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de l'O<sub>3</sub> au cours du temps, notamment pour approfondir les mécanismes sous-évalués de pré-conditionnement (Agathokleous et al., 2019)

ou d'effet « mémoire » (Oksanen & Saleem, 1999). Ces mécanismes pourraient permettre de mieux intégrer l'évolution temporelle de la réponse dans les modèles prédictifs.

#### **VI.4. Enjeux pour la modélisation**

Nos résultats confirment l'importance de prendre en compte le flux d'O<sub>3</sub> entrant régulé par l'ouverture des stomates. Une meilleure modélisation de ce flux nécessite une meilleure modélisation du comportement du stomate. Comme suggéré par de nombreux auteurs, ce modèle doit intégrer une approche mécanistique (Cailleret et al., 2018; Damour et al., 2010) et inclure l'effet de la sécheresse et du « sluggishness » (Hoshika et al., 2017b). De plus, il est nécessaire d'introduire une composante associée à la détoxification cellulaire, puisque les capacités de détoxification sont étroitement liées au flux d'O<sub>3</sub> entrant. Il reste à définir le seuil à partir duquel les défenses sont dépassées. Bien que des modèles essayent de coupler les échanges gazeux et la détoxification (Emberson et al., 2018; Tuzet et al., 2019), l'évolution temporelle et la compartimentation cellulaire et tissulaire des mécanismes de défense complexifient leur paramétrisation. Leur prise en compte est pourtant nécessaire pour améliorer les modèles qui nous permettent de mieux comprendre le fonctionnement complexe de l'arbre en interaction avec son environnement, et ainsi tenter de prédire le risque encouru par les forêts à cause de la combinaison de facteurs environnementaux. La modélisation doit donc être intégrée en amont dans les programmes de recherche. De plus, il est nécessaire de mettre en place des études pluridisciplinaires impliquant modélisateurs et physiologistes pour appréhender des mécanismes de régulation complexes. Pour cela, il apparaît indispensable de paramétrer les modèles avec des données reproductibles d'une expérimentation à l'autre ou d'un génotype/espèce à l'autre. Par exemple, ce n'est pas encore le cas pour le dosage de ROS, alors qu'il est primordial pour définir le stress oxydant. Pour finir, des processus complexes sont également à prendre en compte, tels que les modifications à court et long terme, l'effet du pré-conditionnement et de la récupération, sans négliger l'importance et l'implication de la compartimentation des antioxydants (Dusart et al., 2019a; Noctor et al., 2017; Zechmann, 2017).



# Conclusion

---

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'approfondir la compréhension des mécanismes de réponse des arbres soumis à l'O<sub>3</sub> et à la sécheresse. La combinaison des deux facteurs de stress résulte en un effet protecteur du déficit hydrique vis-à-vis de l'O<sub>3</sub> via la limitation du flux de gaz entrant dans les feuilles. Néanmoins, une réduction importante de croissance due au déficit hydrique est présente. La régulation par les stomates du flux d'O<sub>3</sub> entrant dans les feuilles est primordiale pour comprendre les différences entre traitements et entre génotypes. A l'échelle de la feuille, la réponse à l'O<sub>3</sub> est génotype-dépendante : Carpaccio évite l'entrée d'O<sub>3</sub> tandis que Robusta maximise son assimilation au détriment des feuilles matures. Des acteurs de la détoxification, tels que les anthocyanes, les flavonols et le glutathion, sont, quant à eux, corrélés à la dose d'O<sub>3</sub> entrante dans la feuille. En réalité, les deux génotypes mettent en place des stratégies différentes de réponse. Pour approfondir la compréhension de ces mécanismes dose-dépendants, il apparaît nécessaire de mettre en place des designs expérimentaux précis et spécifiques, sans toutefois négliger l'impact des stress sur le plant dans son ensemble. En effet, il est important de prendre en compte les modifications sur l'arbre entier et à différents étages foliaires pour pouvoir ensuite réaliser un changement d'échelle, extrapoler des feuilles à l'arbre. De leur côté, les phytohormones semblent avoir un rôle déterminant lors de la mise en place des défenses et de l'induction de processus à long terme pouvant impacter la sénescence accélérée et la mort cellulaire. L'étude de ces phytohormones et leur rôle nécessite donc une recherche approfondie et ouvre la voie à une pléthore d'expérimentations. Il s'agirait alors de comprendre les mécanismes complexes qui sous-tendent la relation entre la production de ROS et le flux d'O<sub>3</sub> entrant auquel elle est directement corrélée. Une autre piste à explorer concerne la régulation du statut redox par les mécanismes de détoxification cellulaire, qui coordonnent la mise en place d'une régulation physiologique profonde via les phytohormones. Pour finir, il serait primordial de définir un seuil d'O<sub>3</sub> entrant à partir duquel tel ou tel mécanisme est déclenché.

# Bibliographie

---

- Abou-Attia, M.A., Wang, X., Nashaat Al-Attala, M., Xu, Q., Zhan, G., Kang, Z., 2016. *TaMDAR6* acts as a negative regulator of plant cell death and participates indirectly in stomatal regulation during the wheat stripe rust-fungus interaction. *Physiol. Plant.* 156, 262–277.
- Abreu, M.E., Munné-Bosch, S., 2008. Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: A case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environ. Exp. Bot.* 64, 105–112.
- Agathokleous, E., Belz, R.G., Calatayud, V., De Marco, A., Hoshika, Y., Kitao, M., Saitanis, C.J., Sicard, P., Paoletti, E., Calabrese, E.J., 2019. Predicting the effect of ozone on vegetation via linear non-threshold (LNT), threshold and hormetic dose-response models. *Sci. Total Environ.* 61–74.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76.
- Ahlfors, R., 2004. Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 Belongs to the WWE Protein-Protein Interaction Domain Protein Family and Modulates Abscisic Acid, Ethylene, and Methyl Jasmonate Responses. *Plant Cell Online* 16, 1925–1937.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H. (Ted), Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manag.* 259, 660–684.
- Anav, A., Liu, Q., De Marco, A., Proietti, C., Savi, F., Paoletti, E., Piao, S., 2018. The role of plant phenology in stomatal ozone flux modeling. *Glob. Change Biol.* 24, 235–248.
- Asada, K., 1984. Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* 105, 422–429.
- Avnery, S., Mauzerall, D.L., Liu, J., Horowitz, L.W., 2011a. Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. *Atmos. Environ.* 45, 2284–2296.
- Avnery, S., Mauzerall, D.L., Liu, J., Horowitz, L.W., 2011b. Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O<sub>3</sub> pollution. *Atmos. Environ.* 45, 2297–2309.
- Bagard, M., 2008. Impact de l’ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (*Populus x canescens* [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire : Aspects écophysiologicals et cellulaires. Nancy 1.
- Bagard, M., Jolivet, Y., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Gérard, J., Dizengremel, P., Le Thiec, D., 2015. Ozone exposure and flux-based response functions for photosynthetic traits in wheat, maize and poplar. *Environ. Pollut.* 206, 411–420.
- Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., Jolivet, Y., 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiol. Plant.* 134, 559–574.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollmack, D., Dietz, K.-J., 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell Environ.* 28, 1012–1020.
- Ball, J.T., Woodrow, I.E., Berry, J.A., 1987. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *Prog. Photosynth. Res.* 221–224.

- Bandurska, H., Stroiński, A., Kubiś, J., 2003. The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Acta Physiol. Plant.* 25, 279–285.
- Bansal, S., Hallsby, G., Löfvenius, M.O., Nilsson, M.-C., 2013. Synergistic, additive and antagonistic impacts of drought and herbivory on *Pinus sylvestris*: leaf, tissue and whole-plant responses and recovery. *Tree Physiol.* 33, 451–463.
- Barradas, V.L., Jones, H.G., Clark, J.A., 1994. Stomatal responses to changing irradiance in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 45, 931–936.
- Bashandy, T., Guilleminot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y., Reichheld, J.-P., 2010. Interplay between the NADP-Linked Thioredoxin and Glutathione Systems in *Arabidopsis* Auxin Signaling. *Plant Cell* 22, 376–391.
- Bashir, K., Nagasaka, S., Itai, R.N., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2007. Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. *Plant Mol. Biol.* 65, 277–284.
- Bates, Douglas, Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *J. Stat. Softw.* 67.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240.
- Behr, M., Motyka, V., Weihmann, F., Malbeck, J., Deising, H.B., Wirsel, S.G.R., 2012. Remodeling of Cytokinin Metabolism at Infection Sites of *Colletotrichum graminicola* on Maize Leaves. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 1073–1082.
- Bizet, F., Bogeat-Triboulot, M.-B., Montpied, P., Christophe, A., Ningre, N., Cohen, D., Hummel, I., 2015. Phenotypic plasticity toward water regime: response of leaf growth and underlying candidate genes in *Populus*. *Physiol. Plant.* 154, 39–53.
- Boatwright, J.L., Pajeroska-Mukhtar, K., 2013. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol. Plant Pathol.* 14, 623–634.
- Bogeat-Triboulot, M.-B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.-F., Polle, A., Kangasjärvi, J., Dreyer, E., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol.* 143, 876–892.
- Bohler, S., 2010. Les effets de l’ozone sur les processus foliaires du peuplier : une approche protéomique. Nancy 1.
- Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J.-F., Dizengremel, P., Renaut, J., 2007. A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 7, 1584–1599.
- Bohler, S., Sergeant, K., Jolivet, Y., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Dizengremel, P., Renaut, J., 2013. A physiological and proteomic study of poplar leaves during ozone exposure combined with mild drought. *Proteomics* 13, 1737–1754.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Braun, S., Schindler, C., Rihm, B., 2014. Growth losses in Swiss forests caused by ozone: Epidemiological data analysis of stem increment of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* Karst. *Environ. Pollut.* 192, 129–138.

- Bréda, N., Huc, R., Granier, A., Dreyer, E., 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* 63, 625–644.
- Brodribb, T.J., McAdam, S.A.M., 2011. Passive Origins of Stomatal Control in Vascular Plants. *Science* 331, 6.
- Buckley, T.N., Mott, K.A., 2002. Dynamics of stomatal water relations during the humidity response: implications of two hypothetical mechanisms. *Plant Cell Environ.* 25, 407–419.
- Büker, P., Morrissey, T., Briolat, A., Falk, R., Simpson, D., Tuovinen, J.-P., Alonso, R., Barth, S., Baumgarten, M., Grulke, N., Karlsson, P.E., King, J., Lagergren, F., Matyssek, R., Nunn, A., Ogaya, R., Peñuelas, J., Rhea, L., Schaub, M., Uddling, J., Werner, W., Emberson, L.D., 2012. DO<sub>3</sub>SE modelling of soil moisture to determine ozone flux to forest trees. *Atmospheric Chem. Phys.* 12, 5537–5562.
- Bunce, J.A., 1997. Does transpiration control stomatal responses to water vapour pressure deficit? *Plant Cell Environ.* 20, 131–135.
- Burkey, K.O., Eason, G., 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplast. *Physiol. Plant.* 114, 387–394.
- Cabane, M., Pireaux, J.-C., Léger, E., Weber, E., Dizengremel, P., Pollet, B., Lapierre, C., 2004. Condensed Lignins Are Synthesized in Poplar Leaves Exposed to Ozone. *Plant Physiol.* 134, 586–594.
- Cailleret, M., Ferretti, M., Gessler, A., Rigling, A., Schaub, M., 2018. Ozone effects on European forest growth—Towards an integrative approach. *J. Ecol.* 106, 1377–1389.
- Caird, M.A., Richards, J.H., Donovan, L.A., 2007. Nighttime stomatal conductance and transpiration in C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* 143, 4–10.
- Calatayud, V., Cerveró, J., Calvo, E., García-Breijo, F.-J., Reig-Armiñana, J., Sanz, M.J., 2011. Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environ. Pollut.* 159, 55–63.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Lo Schiavo, F., 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216, 413–421.
- Castagna, A., Ranieri, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O<sub>3</sub> uptake to gene expression adjustment. *Environ. Pollut.* 157, 1461–1469.
- Castell, J.-F., Thiec, D.L., 2016. Impacts de l’ozone sur l’agriculture et les forêts et estimation des coûts économiques. *Pollut. Atmos.*
- Chalker-Scott, L., 2018. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochem. Photobiol.* 70, 1–9.
- Chaves, M.M., 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365–2384.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89, 907–916.
- Choat, B., Jansen, S., Brodribb, T.J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S.J., Feild, T.S., Gleason, S.M., Hacke, U.G., Jacobsen, A.L., Lens, F., Maherali, H., Martínez-Vilalta, J., Mayr, S., Mencuccini, M., Mitchell, P.J., Nardini, A., Pittermann, J., Pratt, R.B., Sperry, J.S., Westoby, M., Wright, I.J., Zanne, A.E., 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755.
- Ciais, Ph., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogée, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, Chr., Carrara, A., Chevallier, F., De Noblet, N., Friend, A.D., Friedlingstein, P., Grünwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G.,

- Loustau, D., Manca, G., Matteucci, G., Miglietta, F., Ourcival, J.M., Papale, D., Pilegaard, K., Rambal, S., Seufert, G., Soussana, J.F., Sanz, M.J., Schulze, E.D., Vesala, T., Valentini, R., 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437, 529–533.
- Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M.-B., Tisserant, E., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.-L., Lelandais, G., Ningre, N., Renou, J.-P., Tamby, J.-P., Le Thiec, D., Hummel, I., 2010. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11, 1–21.
- Conklin, P.L., Barth, C., 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ.* 27, 959–970.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Delledonne, M., Lamattina, L., 2013. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64, 3339–3349.
- Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Guidi, L., Landi, M., Lorenzini, G., Massai, R., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Vernieri, P., Nali, C., 2017a. Losing the Warning Signal: Drought Compromises the Cross-Talk of Signaling Molecules in *Quercus ilex* Exposed to Ozone. *Front. Plant Sci.* 8.
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Guidi, L., Lorenzini, G., Massai, R., Nali, C., Landi, M., 2017b. Cross-Talk between Physiological and Metabolic Adjustments Adopted by *Quercus cerris* to Mitigate the Effects of Severe Drought and Realistic Future Ozone Concentrations. *Forests* 8, 148.
- Dai, L., Feng, Z., Pan, X., Xu, Y., Li, P., Lefohn, A.S., Harmens, H., Kobayashi, K., 2018. Increase of apoplastic ascorbate induced by ozone is insufficient to remove the negative effects in tobacco, soybean and poplar. *Environ. Pollut.* 245, 380–388.
- Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H., Urban, L., 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ.* 33, 1419–1438.
- Darling, E.S., McClanahan, T.R., Côté, I.M., 2010. Combined effects of two stressors on Kenyan coral reefs are additive or antagonistic, not synergistic. *Conserv. Lett.* 3, 122–130.
- Daszkowska-Golec, A., Szarejko, I., 2013. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front. Plant Sci.* 4, 1–16.
- Davey, M.W., Dekempeneer, E., Keulemans, J., 2003. Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Anal. Biochem.* 316, 74–81.
- Davies, P.J. (Ed.), 2004. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*, 3rd ed. ed. Kluwer Academic, Dordrecht ; Boston.
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S., de Pinto, M.C., 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, S13–S19.
- Delmas, R., Mégie, G., Peuch, V.-H. (Eds.), 2005. *Physique et chimie de l’atmosphère, Échelles*. Belin, Paris.
- Dghim, A.A., 2012. Régulation du métabolisme carboné sous ozone: rôles de la PhosphoEnolPyruvate carboxylase (PEPC) et des enzymes NADP-dépendantes. Université de Lorraine.
- Dghim, A.A., Dumont, J., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Dizengremel, P., Le Thiec, D., Jolivet, Y., 2013. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. *Physiol. Plant.* 148, 36–50.

- D'Haese, D., Vandermeiren, K., Asard, H.A.N., Horemans, N., 2005. Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ.* 28, 623–632.
- Di Baccio, D., Castagna, A., Paoletti, E., Sebastiani, L., Ranieri, A., 2008. Could the differences in O<sub>3</sub> sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O<sub>3</sub> influx? *Tree Physiol.* 28, 1761–1772.
- Di Baccio, D., Kopriva, S., Sebastiani, L., Rennenberg, H., 2005. Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? *New Phytol.* 167, 73–80.
- Directive 2008/50/CE [WWW Document], n.d. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/fr/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0050> (accessed 1.10.19).
- Dixon, M., Le Thiec, D., Garrec, J.P., 1998. Reactions of Norway spruce and beech trees to 2 years of ozone exposure and episodic drought. *Environ. Exp. Bot.* 40, 77–91.
- Dizengremel, P., 2001. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 729–742.
- Dizengremel, P., Citerne, A., 1988. Air pollutant effects on mitochondria and respiration. *Elsevier Appl. Sci.* 168–188.
- Dizengremel, P., Jolivet, Y., Tuzet, A., Ranieri, A., Le Thiec, D., 2013. Integrative leaf-level phytotoxic ozone dose assessment for forest risk modelling. *Clim. Change Air Pollut. Glob. Chall. Underst. Perspect. For. Res.* 13, 267–288.
- Dizengremel, P., Pétrini, M., 1994. Effects of air pollutants on the pathways of carbohydrate breakdown. In: Alscher, R.G., Wellburn, A.R. (Eds.), *Plant Responses to the Gaseous Environment: Molecular, Metabolic and Physiological Aspects*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 255–278.
- Dizengremel, P., Sasek, T.W., Brown, K.J., Richardson, C.J., 1994. Ozone-induced changes in primary carbon metabolism enzymes of loblolly pine needles. *J. Plant Physiol.* 144, 300–306.
- Dobrev, P.I., Kamínek, M., 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 950, 21–29.
- Dobrev, P.I., Vankova, R., 2012. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. In: *Plant Salt Tolerance*. Springer, pp. 251–261.
- Dumont, J., 2013. Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxification foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation. Université de Lorraine.
- Dumont, J., Cohen, D., Gérard, J., Jolivet, Y., Dizengremel, P., Le Thiec, D., 2014a. Distinct responses to ozone of abaxial and adaxial stomata in three Euramerican poplar genotypes. *Plant Cell Environ.* 37, 2064–2076.
- Dumont, J., Keski-Saari, S., Keinänen, M., Cohen, D., Ningre, N., Kontunen-Soppela, S., Baldet, P., Gibon, Y., Dizengremel, P., Vaultier, M.-N., Jolivet, Y., Oksanen, E., Le Thiec, D., 2014b. Ozone affects ascorbate and glutathione biosynthesis as well as amino acid contents in three Euramerican poplar genotypes. *Tree Physiol.* 34, 253–266.
- Dumont, J., Spicher, F., Montpied, P., Dizengremel, P., Jolivet, Y., Le Thiec, D., 2013. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO<sub>2</sub> and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* × *Populus nigra* genotypes. *Environ. Pollut.* 173, 85–96.
- Durand, M., Brendel, O., Buré, C., Le Thiec, D., 2019a. Altered stomatal dynamics induced by changes in irradiance and vapour-pressure deficit under drought: impact on the whole plant transpiration efficiency of poplar species. *New Phytol.*

- Durand, M., Brendel, O., Buré, C., Thiec, D.L., 2019b. Altered stomatal dynamics induced by changes in irradiance and vapour-pressure deficit under drought: impacts on the whole plant transpiration efficiency of poplar genotypes. *New Phytol.*
- Dusart, N., Gandin, A., Vaultier, M.-N., Joffe, R., Cabané, M., Dizengremel, P., Jolivet, Y., 2019a. Importance of Detoxification Processes in Ozone Risk Assessment: Need to Integrate the Cellular Compartmentation of Antioxidants? *Front. For. Glob. Change* 2, 45.
- Dusart, N., Gérard, J., Le Thiec, D., Collignon, C., Jolivet, Y., Vaultier, M.-N., 2019b. Integrated analysis of the detoxification responses of two Euramerican poplar genotypes exposed to ozone and water deficit: Focus on the ascorbate-glutathione cycle. *Sci. Total Environ.* 2365–2379.
- Edreva, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 119–133.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278–284.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol. Plant.* 127, 57–65.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2007. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225, 1255–1264.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D., Tuovinen, J.-P., 2000a. Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environ. Pollut.* 109, 403–413.
- Emberson, L.D., Büker, P., Ashmore, M.R., 2007. Assessing the risk caused by ground level ozone to European forest trees: A case study in pine, beech and oak across different climate regions. *Environ. Pollut., Air Pollution and Climate Change: A Global Overview of the Effects on Forest Vegetation* 147, 454–466.
- Emberson, L.D., Pleijel, H., Ainsworth, E.A., van den Berg, M., Ren, W., Osborne, S., Mills, G., Pandey, D., Dentener, F., Büker, P., Ewert, F., Koeble, R., Van Dingenen, R., 2018. Ozone effects on crops and consideration in crop models. *Eur. J. Agron.*
- Emberson, L.D., Wieser, G., Ashmore, M.R., 2000b. Modelling of stomatal conductance and ozone flux of Norway spruce: comparison with field data. *Environ. Pollut.* 109, 393–402.
- Eun, S.-O., Lee, Y., 1997. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiol.* 115, 1491–1498.
- Fares, S., Matteucci, G., Scarascia Mugnozza, G., Morani, A., Calfapietra, C., Salvatori, E., Fusaro, L., Manes, F., Loreto, F., 2013. Testing of models of stomatal ozone fluxes with field measurements in a mixed Mediterranean forest. *Atmos. Environ.* 67, 242–251.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345.
- Feng, Z., Sun, J., Wan, W., Hu, E., Calatayud, V., 2014. Evidence of widespread ozone-induced visible injury on plants in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 193, 296–301.
- Flohé, L., 2013. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Cellular functions of glutathione 1830, 3139–3142.
- Fontaine, V., Pelloux, J., Podor, M., Afif, D., Gérant, D., Grieu, P., Dizengremel, P., 1999. Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-

- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Plant.* 105, 187–192.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2016. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ.* 39, 951–964.
- Francini, A., Nali, C., Picchi, V., Lorenzini, G., 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environ. Exp. Bot.* 60, 11–19.
- Fuhrer, J., Skärby, L., Ashmore, M.R., 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environ. Pollut.* 97, 91–106.
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P.I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M., Motyka, V., 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2827–2840.
- Gandin, A., Davrinche, A., Jolivet, Y., 2019. Deciphering the main determinants of O<sub>3</sub> tolerance in Euramerican poplar genotypes. *Sci. Total Environ.* 656, 681–690.
- Gao, F., Catalayud, V., Paoletti, E., Hoshika, Y., Feng, Z., 2017. Water stress mitigates the negative effects of ozone on photosynthesis and biomass in poplar plants. *Environ. Pollut.* 230, 268–279.
- Gaudel, A., Cooper, O.R., Ancellet, G., Barret, B., Boynard, A., Burrows, J.P., Clerbaux, C., Coheur, P.-F., Cuesta, J., Cuevas Agulló, E., 2018. Tropospheric Ozone Assessment Report: Present-day distribution and trends of tropospheric ozone relevant to climate and global atmospheric chemistry model evaluation.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., Romeis, T., Hedrich, R., 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21425–21430.
- Gerant, D., Podor, M., Grieu, P., Afif, D., Cornu, S., Morabito, D., Banvoy, J., Robin, C., Dizengremel, P., 1996. Carbon Metabolism Enzyme Activities and Carbon Partitioning in *Pinus halepensis* Mill, exposed to Mild Drought and Ozone. *J. Plant Physiol.* 148, 142–147.
- Gérardin, T., Douthe, C., Flexas, J., Brendel, O., 2018. Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ. Exp. Bot.* 153, 188–197.
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N., 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 204–212.
- Granier, A., Bréda, N., Biron, P., Villette, S., 1999. A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecol. Model.* 116, 269–283.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207–212.
- Gulke, N.E., Alonso, R., Nguyen, T., Cascio, C., Dobrowolski, W., 2004. Stomata open at night in pole-sized and mature ponderosa pine: implications for O<sub>3</sub> exposure metrics. *Tree Physiol.* 24, 1001–1010.
- Gulke, N.E., Neufeld, H.S., Davison, A.W., Roberts, M., Chappelka, A.H., 2007. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains National Park. *New Phytol.* 173, 100–109.



- Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Filippi, F., Soldatini, G.F., 2001. Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environ. Pollut.* 113, 245–254.
- Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P., 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environ. Pollut.* 147, 467–488.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Gunin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.-F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O., 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol. J.* 6, 609–618.
- Haagen-Smit, A.J., Darley, E.F., Zaitlin, M., Hull, H., Noble, W., 1952. Investigation on Injury to Plants from Air Pollution in the Los Angeles Area. *Plant Physiol.* 27, 18–34.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Harmens, H., Mills, G., Hayes, F., Sharps, K., Frontasyeva, M., 2016. *Air Pollution and Vegetation*. ICP Végétation 35.
- Hartig, K., Beck, E., 2006. Crosstalk between Auxin, Cytokinins, and Sugars in the Plant Cell Cycle. *Plant Biol.* 8, 389–396.
- Hayes, F., Bangor, C., 2017. *Manual on Methodologies and Criteria for Modelling and Mapping Critical Loads & Levels and Air Pollution Effects, Risks and Trends, Chapter III: mapping critical levels for vegetation*. Presented at the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901–908.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., Hasezawa, S., 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 61, 156–165.
- Horowitz, L.W., 2006. Past, present, and future concentrations of tropospheric ozone and aerosols: Methodology, ozone evaluation, and sensitivity to aerosol wet removal. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 111.
- Hoshika, Y., Fares, S., Savi, F., Gruening, C., Goded, I., De Marco, A., Sicard, P., Paoletti, E., 2017a. Stomatal conductance models for ozone risk assessment at canopy level in two Mediterranean evergreen forests. *Agric. For. Meteorol.* 234–235, 212–221.
- Hoshika, Y., Katata, G., Deushi, M., Watanabe, M., Koike, T., Paoletti, E., 2015. Ozone-induced stomatal sluggishness changes carbon and water balance of temperate deciduous forests. *Sci. Rep.* 5, 1–8.
- Hoshika, Y., Moura, B., Paoletti, E., 2018. Ozone risk assessment in three oak species as affected by soil water availability. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8125–8136.
- Hoshika, Y., Omasa, K., Paoletti, E., 2013. Both ozone exposure and soil water stress are able to induce stomatal sluggishness. *Environ. Exp. Bot.* 88, 19–23.
- Hoshika, Y., Watanabe, M., Carrari, E., Paoletti, E., Koike, T., 2017b. Ozone-induced stomatal sluggishness changes stomatal parameters of Jarvis-type model in white birch and deciduous oak. *Plant Biol.* 20–28.
- Hossain, M.A., Asada, K., 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25, 85–92.

- Hu, E., Gao, F., Xin, Y., Jia, H., Li, K., Hu, J., Feng, Z., 2015. Concentration-and flux-based ozone dose–response relationships for five poplar clones grown in North China. *Environ. Pollut.* 207, 21–30.
- Hughes, N.M., Morley, C.B., Smith, W.K., 2018. Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytol.* 175, 675–685.
- Inada, H., Kondo, T., Akhtar, N., Hoshino, D., Yamaguchi, M., Izuta, T., 2012. Relationship between cultivar difference in the sensitivity of net photosynthesis to ozone and reactive oxygen species scavenging system in Japanese winter wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 146, 217–227.
- IPCC, 2014. Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York.
- Iriti, M., Faoro, F., 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water. Air. Soil Pollut.* 187, 285–301.
- Isebrands, J.G., Richardson, J. (Eds.), 2013. Poplars and willows: trees for society and the environment. CABI ; FAO, Boston, MA : Rome.
- Jacquot, J.P., Dietz, K.-J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P.A., Selles, B., Hecker, A., 2013. Redox regulation in plants: glutathione and “redoxin” related families. In: *Oxidative Stress and Redox Regulation*. Springer, pp. 213–231.
- Janda, M., Ruelland, E., 2015. Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environ. Exp. Bot., Plant signalling mechanisms in response to the environment* 114, 117–128.
- Jarvis, P.G., 1976. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 593–610.
- Jaspers, P., Kangasjärvi, J., 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol. Plant.* 138, 405–413.
- Jolivet, Y., Bagard, M., Cabané, M., Vaultier, M.-N., Gandin, A., Afif, D., Dizengremel, P., Le Thiec, D., 2016. Deciphering the ozone-induced changes in cellular processes: a prerequisite for ozone risk assessment at the tree and forest levels. *Ann. For. Sci.* 73, 923–943.
- Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L., Hirt, H., 2002. Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 415–424.
- Jubany-Mari, T., Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol. Biochem., Antioxidants and redox regulation in plants* 48, 351–358.
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., Lopez-Lauri, F., 2014. Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *Am. J. Anal. Chem.* 05, 730–736.
- Kalabokas, P., Hjorth, J., Foret, G., Dufour, G., Eremenko, M., Siour, G., Cuesta, J., Beekmann, M., 2017. An investigation on the origin of regional springtime ozone episodes in the western Mediterranean. *Atmos Chem Phys* 17, 3905–3928.
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P., Kollist, H., 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environ.* 28, 1021–1036.
- Kärenlampi, L., Skärby, L., 1996. Critical levels for ozone in Europe. In: *UN-ECE Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution Workshop (1996: Kuopio, Finland)*. University of Kuopio, Dept. of Ecology and Environmental Science.
- Karlsson, P.E., Pleijel, H., Karlsson, G.P., Medin, E.L., Skärby, L., 2000. Simulations of stomatal conductance and ozone uptake to Norway spruce saplings in open-top chambers. *Environ. Pollut.* 109, 443–451.

- Kavitha, K., George, S., Venkataraman, G., Parida, A., 2010. A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte *Avicennia marina* confers salt stress tolerance on transgenic plants. *Biochimie* 92, 1321–1329.
- Kazan, K., 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 20, 219–229.
- Kazan, K., Manners, J.M., 2012. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17, 22–31.
- Kim, E.H., Kim, Y.S., Park, S.-H., Koo, Y.J., Choi, Y.D., Chung, Y.-Y., Lee, I.-J., Kim, J.-K., 2009. Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant Physiol.* 149, 1751–1760.
- Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G., Hwang, I., 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 814–819.
- Knudson, L.L., Tibbitts, T.W., Edwards, G.E., 1977. Measurement of Ozone Injury by Determination of Leaf Chlorophyll Concentration. *Plant Physiol.* 60, 606–608.
- Koch, J.R., Scherzer, A.J., Eshita, S.M., Davis, K.R., 1998. Ozone Sensitivity in Hybrid Poplar Is Correlated with a Lack of Defense-Gene Activation. *Plant Physiol.* 118, 1243–1252.
- Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., Kumar, P.P., 2013. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* 32, 945–957.
- Kolb, T.E., Fredericksen, T.S., Steiner, K.C., Skelly, J.M., 1997. Issues in scaling tree size and age responses to ozone: a review. *Environ. Pollut.* 98, 195–208.
- Kollist, H., Nuhkat, M., Roelfsema, M.R.G., 2014. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol.* 203, 44–62.
- Krasensky-Wrzaczek, J., Kangasjärvi, J., 2018. The role of ROS in the integration of temperature and light signals. *J. Exp. Bot.*
- Laisk, A., Kull, O., Moldau, H., 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol.* 90, 1163–1167.
- Lallement, P.-A., Roret, T., Tsan, P., Gualberto, J.M., Girardet, J.-M., Didierjean, C., Rouhier, N., Hecker, A., 2016. Insights into ascorbate regeneration in plants: investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from *Populus trichocarpa*. *Biochem. J.* 473, 717–731.
- Landi, M., Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Nali, C., Guidi, L., Massai, R., Vernieri, P., Lorenzini, G., 2019. When “thirsty” means “less able to activate the signalling wave triggered by a pulse of ozone”: A case of study in two Mediterranean deciduous oak species with different drought sensitivity. *Sci. Total Environ.* 657, 379–390.
- Langebartels, C., Heller, W., Führer, G., Lippert, M., Simons, S., Sandermann, H., 1998. Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 62–72.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K.-J., 2019. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants* 8, 94.
- Lee, J.D., Lewis, A.C., Monks, P.S., Jacob, M., Hamilton, J.F., Hopkins, J.R., Watson, N.M., Saxton, J.E., Ennis, C., Carpenter, L.J., Carslaw, N., Fleming, Z., Bandy, B.J., Oram, D.E., Penkett, S.A., Slemr, J., Norton, E., Rickard, A.R., K Whalley, L., Heard, D.E., Bloss, W.J., Gravestock, T., Smith, S.C., Stanton, J., Pilling, M.J., Jenkin, M.E., 2006. Ozone photochemistry and elevated isoprene during the UK heatwave of august 2003. *Atmos. Environ.* 40, 7598–7613.
- Lefohn, A.S., Foley, J.K., 1992. NCLAN Results and their Application to the Standard-Setting Process: Protecting Vegetation from Surface Ozone Exposures. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 42, 1046–1052.

- Lehner, B., Döll, P., Alcamo, J., Henrichs, T., Kaspar, F., 2006. Estimating the Impact of Global Change on Flood and Drought Risks in Europe: A Continental, Integrated Analysis. *Clim. Change* 75, 273–299.
- Lenth, R.V., 2016. Least-Squares Means: The R Package **lsmeans**. *J. Stat. Softw.* 69.
- Li, F., Wu, Q.-Y., Sun, Y.-L., Wang, L.-Y., Yang, X.-H., Meng, Q.-W., 2010. Overexpression of chloroplastic monodehydroascorbate reductase enhanced tolerance to temperature and methyl viologen-mediated oxidative stresses. *Physiol. Plant.*
- Li, P., Feng, Z., Catalayud, V., Yuan, X., Xu, Y., Paoletti, E., 2017. A meta-analysis on growth, physiological, and biochemical responses of woody species to ground-level ozone highlights the role of plant functional types. *Plant Cell Environ.* 40, 2369–2380.
- Lichtenthaler, H.K., 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 187–198.
- Lightfoot, P.D., Cox, R.A., Crowley, J.N., Destriau, M., Hayman, G.D., Jenkin, M.E., Moortgat, G.K., Zabel, F., 1992. Organic peroxy radicals: Kinetics, spectroscopy and tropospheric chemistry. *Atmospheric Environ. Part Gen. Top.* 26, 1805–1961.
- Lim, P.O., Kim, H.J., Gil Nam, H., 2007. Leaf Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 115–136.
- Liu, C., Allan, R.P., 2013. Observed and simulated precipitation responses in wet and dry regions 1850–2100. *Environ. Res. Lett.* 8, 034002.
- Liu, Y.-J., Yuan, Y., Liu, Y.-Y., Liu, Y., Fu, J.-J., Zheng, J., Wang, G.-Y., 2012. Gene families of maize glutathione–ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 169, 183–192.
- Lombardozzi, D., Levis, S., Bonan, G., Sparks, J.P., 2012. Predicting photosynthesis and transpiration responses to ozone: decoupling modeled photosynthesis and stomatal conductance. *Biogeosciences Discuss.* 9, 4245–4283.
- Marron, N., 2003. Écophysiologie des peupliers euraméricains en réponse à la sécheresse 217.
- Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J.-M., Delmotte, F.M., Brignolas, F., 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus canadensis* (Moench) clones, ‘Dorskamp’ and ‘Luisa\_Avanzo.’ *Tree Physiol.* 23, 1225–1235.
- Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P., Nunn, A.J., Häberle, K.-H., 2006. Interactions between Drought and O<sub>3</sub> Stress in Forest Trees. *Plant Biol.* 8, 11–17.
- Matyssek, R., Wieser, G., Calfapietra, C., de Vries, W., Dizengremel, P., Ernst, D., Jolivet, Y., Mikkelsen, T.N., Mohren, G.M.J., Le Thiec, D., Tuovinen, J.-P., Weatherall, A., Paoletti, E., 2012. Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environ. Pollut.* 160, 57–65.
- McAdam, E.L., Brodribb, T.J., McAdam, S.A.M., 2017. Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close? *Plant Cell Environ.* 40, 741–747.
- McAdam, S.A.M., Brodribb, T.J., 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* 167, 833–843.
- McAinsh, M.R., Evans, N.H., Montgomery, L.T., North, K.A., 2002. Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytol.* 153, 441–447.
- Meinhard, M., Grill, E., 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *Febs Lett.* 508, 443–446.
- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K., Kollist, H., 2018. Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA. *Plant Physiol.* 176, 851–864.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Tacconat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J.-P., Noctor, G., 2010. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular

- hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol.* 153, 1144–1160.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467.
- Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S., Davies, W.J., 2009. Chronic exposure to increasing background ozone impairs stomatal functioning in grassland species. *Glob. Change Biol.* 15, 1522–1533.
- Mills, G., Pleijel, H., Braun, S., Büker, P., Bermejo, V., Calvo, E., Danielsson, H., Emberson, L., Fernández, I.G., Grünhage, L., Harmens, H., Hayes, F., Karlsson, P.-E., Simpson, D., 2011. New stomatal flux-based critical levels for ozone effects on vegetation. *Atmos. Environ.* 45, 5064–5068.
- Mills, G., Sharps, K., Simpson, D., Pleijel, H., Broberg, M., Uddling, J., Jaramillo, F., Davies, W.J., Dentener, F., Van den Berg, M., Agrawal, M., Agrawal, S.B., Ainsworth, E.A., Büker, P., Emberson, L., Feng, Z., Harmens, H., Hayes, F., Kobayashi, K., Paoletti, E., Van Dingenen, R., 2018. Ozone pollution will compromise efforts to increase global wheat production. *Glob. Change Biol.* 24, 3560–3574.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mittler, R., 2017. ROS are good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19.
- Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F.M., Delay, D., Petit, J.-M., Barbaroux, C., Le Thiec, D., Brechet, C., Brignolas, F., 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytol.* 169, 765–777.
- Monks, P.S., 2000. A review of the observations and origins of the spring ozone maximum. *Atmos. Environ.* 34, 3545–3561.
- Monks, P.S., Archibald, A.T., Colette, A., Cooper, O., Coyle, M., Derwent, R., Fowler, D., Granier, C., Law, K.S., Mills, G.E., Stevenson, D.S., Tarasova, O., Thouret, V., von Schneidemesser, E., Sommariva, R., Wild, O., Williams, M.L., 2015. Tropospheric ozone and its precursors from the urban to the global scale from air quality to short-lived climate forcer. *Atmos Chem Phys* 15, 8889–8973.
- Morris, K., A. -H. -Mackerness, S., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P., Buchanan-Wollaston, V., 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23, 677–685.
- Moura, B.B., Alves, E.S., Marabesi, M.A., de Souza, S.R., Schaub, M., Vollenweider, P., 2018. Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 610–611, 912–925.
- Munné-Bosch, S., Peñuelas, J., 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217, 758–766.
- Musselman, R.C., Lefohn, A.S., Massman, W.J., Heath, R.L., 2006. A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmos. Environ.* 40, 1869–1888.
- Nagata, T., Todoriki, S., Masumizu, T., Suda, I., Furuta, S., Du, Z., Kikuchi, S., 2003. Levels of Active Oxygen Species Are Controlled by Ascorbic Acid and Anthocyanin in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem* 2992–2999.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., Chory, J., 2006. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell* 126, 467–475.

- Niinemets, Ü., Kull, O., 2001. Sensitivity of photosynthetic electron transport to photoinhibition in a temperate deciduous forest canopy: Photosystem II center openness, non-radiative energy dissipation and excess irradiance under field conditions. *Tree Physiol.* 21, 899–914.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., Tran, L.-S.P., 2011. Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Cell* 23, 2169–2183.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H., 2014. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiol.* 164, 1636–1648.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H., 2016. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ.* 39, 1140–1160.
- Noctor, G., Reichheld, J.-P., Foyer, C.H., 2017. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80, 3–12.
- Nogués, I., Llusà, J., Ogaya, R., Munné-Bosch, S., Sardans, J., Peñuelas, J., Loreto, F., 2014. Physiological and antioxidant responses of *Quercus ilex* to drought in two different seasons. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 148, 268–278.
- Oksanen, E., 2003. Physiological responses of birch (*Betula pendula*) to ozone: a comparison between open-soil-grown trees exposed for six growing seasons and potted seedlings exposed for one season. *Tree Physiol.* 23, 603–614.
- Oksanen, E., Saleem, A., 1999. Ozone exposure results in various carry-over effects and prolonged reduction in biomass in birch (*Betula pendula* Roth). *Plant Cell Environ.* 22, 1401–1411.
- Ollinger, S.V., Aber, J.D., Reich, P.B., 1997. Simulating ozone effects on forest productivity: interactions among leaf-, canopy-, and stand-level processes. *Ecol. Appl.* 7, 1237.
- Oltmans, S.J., Lefohn, A.S., Shadwick, D., Harris, J.M., Scheel, H.E., Galbally, I., Tarasick, D.W., Johnson, B.J., Brunke, E.-G., Claude, H., Zeng, G., Nichol, S., Schmidlin, F., Davies, J., Cuevas, E., Redondas, A., Naoe, H., Nakano, T., Kawasato, T., 2013. Recent tropospheric ozone changes – A pattern dominated by slow or no growth. *Atmos. Environ.* 67, 331–351.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Kangasjärvi, J., 2000. Ozone-Sensitive Arabidopsis *rcd1* Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death. *Plant Cell* 12, 1849–1862.
- Pääkkönen, E., Holopainen, T., Kärenlampi, L., 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth.) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environ. Pollut.* 96, 117–127.
- Pääkkönen, E., Vahala, J., Pohjola, M., Holopainen, T., Kärenlampi, L., 1998. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress. *Plant Cell Environ.* 21, 671–684.
- Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N., 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* 25, 291–299.
- Paoletti, E., Grulke, N.E., 2005. Does living in elevated CO<sub>2</sub> ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal responses. *Environ. Pollut.* 137, 483–493.
- Paoletti, E., Grulke, N.E., 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environ. Pollut.* 158, 2664–2671.

- Paoletti, E., Materassi, A., Fasano, G., Hoshika, Y., Carriero, G., Silaghi, D., Badea, O., 2017. A new-generation 3D ozone FACE (Free Air Controlled Exposure). *Sci. Total Environ.* 575, 1407–1414.
- Park Williams, A., Allen, C.D., Macalady, A.K., Griffin, D., Woodhouse, C.A., Meko, D.M., Swetnam, T.W., Rauscher, S.A., Seager, R., Grissino-Mayer, H.D., Dean, J.S., Cook, E.R., Gangodagamage, C., Cai, M., McDowell, N.G., 2013. Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nat. Clim. Change* 3, 292–297.
- Parrish, D.D., Law, K.S., Staehelin, J., Derwent, R., Cooper, O.R., Tanimoto, H., Volz-Thomas, A., Gilge, S., Scheel, H.-E., Steinbacher, M., Chan, E., 2013. Lower tropospheric ozone at northern midlatitudes: Changing seasonal cycle. *Geophys. Res. Lett.* 40, 1631–1636.
- Pasqualini, S., Batini, P., Ederli, L., Porceddu, A., Piccioni, C., Marchis, F.D., Antonielli, M., 2001. Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant Cell Environ.* 24, 245–252.
- Pauls, K.P., Thompson, J.E., 1982. Effects of cytokinins and antioxidants on the susceptibility of membranes to ozone damage. *Plant Cell Physiol.* 23, 821–832.
- Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H., Blumwald, E., 2011. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol. J.* 9, 747–758.
- Pellegrini, E., Hoshika, Y., Dusart, N., Cotrozzi, L., Gérard, J., Nali, C., Vaultier, M.-N., Jolivet, Y., Lorenzini, G., Paoletti, E., 2019. Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions. *Sci. Total Environ.* 647, 390–399.
- Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J., Dizengremel, P., 2001. Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant Cell Environ.* 24, 123–131.
- Pencik, A., Simonovik, B., Petersson, S.V., Henykova, E., Simon, S., Greenham, K., Zhang, Y., Kowalczyk, M., Estelle, M., Zazimalova, E., Novak, O., Sandberg, G., Ljung, K., 2013. Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid. *Plant Cell* 25, 3858–3870.
- Pessaraki, M., 2018. Plant signaling pathways involved in stomatal movement under drought stress conditions. *Adv. Plants Agric. Res.* 8.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Team, R.C., 2018. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 31-137.
- Pollastrini, M., Desotgiu, R., Camin, F., Ziller, L., Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., 2014. Severe drought events increase the sensitivity to ozone on poplar clones. *Environ. Exp. Bot.* 100, 94–104.
- Polle, A., Wieser, G., Havranek, W.M., 1995. Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst) at high altitude. *Plant Cell Environ.* 18, 681–688.
- Pospíšilová, J., 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol. Plant.* 46, 491–506.
- Pospíšilová, J., Vagner, M., Malbeck, J., Travnickova, A., Batkova, P., 2005. Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biol. Plant.* 49, 533–540.
- Proietti, C., Anav, A., De Marco, A., Sicard, P., Vitale, M., 2016. A multi-sites analysis on the ozone effects on Gross Primary Production of European forests. *Sci. Total Environ.* 556, 1–11.

- Queval, G., Hager, J., Gakiere, B., Noctor, G., 2008. Why are literature data for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *J. Exp. Bot.* 59, 135–146.
- Queval, G., Noctor, G., 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* 363, 58–69.
- Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Issakidis-Bourguet, E., Mhamdi, A., Noctor, G., 2017a. Cytosolic and Chloroplastic DHARs Cooperate in Oxidative Stress-Driven Activation of the Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiol.* 174, 956–971.
- Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Mhamdi, A., Vanacker, H., Noctor, G., 2017b. Glutathione oxidation in response to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signal. Behav.* 12.
- Rahantaniaina, M.-S., Tuzet, A., Mhamdi, A., Noctor, G., 2013. Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front. Plant Sci.* 4.
- Ramade, F., 2009. *Éléments d'écologie : Ecologie fondamentale - 4e édition.* Dunod.
- Ranieri, A., Castagna, A., Padu, E., Moldau, H., Rahi, M., Soldatini, G.F., 1999. The decay of O<sub>3</sub> through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of O<sub>3</sub>-sensitivity in two poplar clones. *J. Plant Physiol.* 154, 250–255.
- Ranieri, A., D'urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol. Plant.* 97, 381–387.
- Rao, M.V., Lee, H., Davis, K.R., 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32, 447–456.
- Regier, N., Streb, S., Coccozza, C., Schaub, M., Cherubini, P., Zeeman, S.C., Frey, B., 2009. Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. *Plant Cell Environ.* 32, 1724–1736.
- Reich, P.B., Lassoie, J.P., 1984. Effects of low level O<sub>3</sub> exposure on leaf diffusive conductance and water-use efficiency in hybrid poplar. *Plant Cell Environ.* 7, 661–668.
- Reich, P.B., Schoettle, A.W., Amundson, R.G., 1985. Effects of low concentrations of O<sub>3</sub>, leaf age and water stress on leaf diffusive conductance and water use efficiency in soybean. *Physiol. Plant.* 63, 58–64.
- Renaut, J., Bohler, S., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Sergeant, K., Ahsan, N., Jolivet, Y., Dizengremel, P., 2009. The impact of atmospheric composition on plants: A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 495–516.
- Rengel, D., Arribat, S., Maury, P., Martin-Magniette, M.-L., Hourlier, T., Laporte, M., Varès, D., Carrère, S., Grieu, P., Balzergue, S., 2012. A gene-phenotype network based on genetic variability for drought responses reveals key physiological processes in controlled and natural environments. *PloS One* 7, e45249.
- Ridolfi, M., Dreyer, E., 1997. Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana* × *trichocarpa* cv. Peace) III. Consequences for photosynthetic carbon assimilation. *New Phytol.* 135, 31–40.
- Riemann, M., Dhakarey, R., Hazman, M., Miro, B., Kohli, A., Nick, P., 2015. Exploring Jasmonates in the Hormonal Network of Drought and Salinity Responses. *Front. Plant Sci.* 6.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., Blumwald, E., 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19631–19636.
- Rouhier, N., Couturier, J., Jacquot, J.-P., 2006. Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J. Exp. Bot.* 57, 1685–1696.



- Samuilov, S., Lang, F., Djukic, M., Djunisijevic-Bojovic, D., Rennenberg, H., 2016. Lead uptake increases drought tolerance of wild type and transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing *gsh 1*. *Environ. Pollut.* 1–13.
- San José, R., Pérez, J.L., González, R.M., Pecci, J., Garzón, A., Palacios, M., 2016. Impacts of the 4.5 and 8.5 RCP global climate scenarios on urban meteorology and air quality: Application to Madrid, Antwerp, Milan, Helsinki and London. *J. Comput. Appl. Math., Efficient Numerical Methods for Large-scale Scientific Computations* 293, 192–207.
- Sanders, G.E., Skärby, L., Ashmore, M.R., Fuhrer, J., 1995. Establishing critical levels for the effects of air pollution on vegetation. *Water. Air. Soil Pollut.* 85, 189–200.
- Sauer, M., Robert, S., Kleine-Vehn, J., 2013. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64, 2565–2577.
- Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I.D., Großkinsky, D.K., Vankova, R., Baldwin, I.T., Meldau, S., 2015. The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *J. Exp. Bot.* 66, 4873–4884.
- Sehmer, L., Fontaine, V., Antoni, F., Dizengremel, P., 1998. Effects of ozone and elevated atmospheric carbon dioxide on carbohydrate metabolism of spruce needles. Catabolic and detoxification pathways. *Physiol. Plant.* 102, 605–611.
- Seo, J.-S., Joo, J., Kim, M.-J., Kim, Y.-K., Nahm, B.H., Song, S.I., Cheong, J.-J., Lee, J.S., Kim, J.-K., Choi, Y.D., 2011. OsHLLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J.* 65, 907–921.
- Sharkey, T.D., Raschke, K., 1980. Effects of Phaseic Acid and Dihydrophaseic Acid on Stomata and the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiol.* 65, 291–297.
- Shigenaga, A.M., Argueso, C.T., 2016. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56, 174–189.
- Sicard, P., Augustaitis, A., Belyazid, S., Calfapietra, C., de Marco, A., Fenn, M., Bytnerowicz, A., Grulke, N., He, S., Matyssek, R., Serengil, Y., Wieser, G., Paoletti, E., 2016a. Global topics and novel approaches in the study of air pollution, climate change and forest ecosystems. *Environ. Pollut.*
- Sicard, P., De Marco, A., Dalstein-Richier, L., Tagliaferro, F., Renou, C., Paoletti, E., 2016b. An epidemiological assessment of stomatal ozone flux-based critical levels for visible ozone injury in Southern European forests. *Sci. Total Environ.* 541, 729–741.
- Silim, S., Nash, R., Reynard, D., White, B., Schroeder, W., 2009. Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (*Populus* spp.) clones with contrasting drought tolerance. *Trees* 23, 959–969.
- Singh, A.A., Singh, S., Agrawal, M., Agrawal, S.B., 2015. Assessment of Ethylene Diurea-Induced Protection in Plants Against Ozone Phytotoxicity. In: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233*. Springer International Publishing, Cham, pp. 129–184.
- Solomon, S., 2007. *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge University Press.
- Spíchal, L., 2012. Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct. Plant Biol.* 39, 267.
- Stolarski, R.S., 2001. History of the Study of Atmospheric Ozone. *Ozone Sci. Eng.* 23, 421–428.
- Street, N.R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., Rodríguez-Acosta, M., Nilsson, P., Jansson, S., Taylor, G., 2006. The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *Plant J.* 48, 321–341.

- Subramanian, N., Karlsson, P.E., Bergh, J., Nilsson, U., 2015. Impact of Ozone on Sequestration of Carbon by Swedish Forests under a Changing Climate: A Modeling Study. *For. Sci.* 61, 445–457.
- Sultana, S., Khew, C.-Y., Morshed, Md.M., Namasivayam, P., Napis, S., Ho, C.-L., 2012. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (AeMDHAR) confers salt tolerance on rice. *J. Plant Physiol.* 169, 311–318.
- Sussmilch, F.C., Brodribb, T.J., McAdam, S.A.M., 2017. What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid (ABA) in land plants? *J. Integr. Plant Biol.* n/a-n/a.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., Hasezawa, S., 2006. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57, 2259–2266.
- Tang, S., Liang, H., Yan, D., Zhao, Y., Han, X., Carlson, J.E., Xia, X., Yin, W., 2013. *Populus euphratica*: the transcriptomic response to drought stress. *Plant Mol. Biol.* 83, 539–557.
- Tang, Z.-X., Yang, H.-L., 2013. Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Mol. Biol. Rep.* 40, 5105–5114.
- Tardieu, F., 2012. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *J. Exp. Bot.* 63, 25–31.
- Tardieu, F., Simonneau, T., 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* 49, 419–432.
- Tausz, M., Grulke, N.E., Wieser, G., 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environ. Pollut.* 147, 525–531.
- Tognetti, V.B., Mühlenbock, P., Breusegem, F.V., 2012. Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ.* 35, 321–333.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K.A., Inze, D., Van Breusegem, F., 2010. Perturbation of Indole-3-Butyric Acid Homeostasis by the UDP-Glucosyltransferase *UGT74E2* Modulates *Arabidopsis* Architecture and Water Stress Tolerance. *Plant Cell* 22, 2660–2679.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20623–20628.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Déjardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C.,

- Marra, M., Sandberg, G., Peer, Y.V. de, Rokhsar, D., 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596–1604.
- Tuzet, A., Perrier, A., Leuning, R., 2003. A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant Cell Environ.* 26, 1097–1116.
- Tuzet, A., Perrier, A., Loubet, B., Cellier, P., 2011. Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agric. For. Meteorol.* 151, 480–492.
- Tuzet, A., Rahantaniaina, M.-S., Noctor, G., 2019. Analyzing the Function of Catalase and the Ascorbate–Glutathione Pathway in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Processing: Insights from an Experimentally Constrained Kinetic Model. *Antioxid. Redox Signal.* 30, 1238–1268.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.
- Vahala, J., 2003a. Differential Effects of Elevated Ozone on Two Hybrid Aspen Genotypes Predisposed to Chronic Ozone Fumigation. Role of Ethylene and Salicylic Acid. *Plant Physiol.* 132, 196–205.
- Vahala, J., 2003b. Ethylene Insensitivity Modulates Ozone-Induced Cell Death in Birch. *Plant Physiol.* 132, 185–195.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., Kangasjärvi, J., 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487–491.
- Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosché, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.-S., Lindgren, O., Salojärvi, J., Loog, M., Kangasjärvi, J., Kollist, H., 2010. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J.* 62, 442–453.
- Van Hove, L.W.A., Bossen, M.E., De Bok, F.A.M., Hooijmaijers, C.A.M., 1999. The uptake of O<sub>3</sub> by poplar leaves: the impact of a long-term exposure to low O<sub>3</sub>-concentrations. *Atmos. Environ.* 33, 907–917.
- Van Hove, L.W.A., Bossen, M.E., San Gabino, B.G., Sgreva, C., 2001. The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: a quantitative approach. *Environ. Pollut.* 114, 371–382.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.
- Vankova, R., Gaudinova, A., Dobrev, P., Malbeck, J., Haisel, D., Motyka, V., 2010. Comparison of salinity and drought stress effects on abscisic acid metabolites activity of cytokinin oxidase/dehydrogenase and chlorophyll levels in radish and tobacco. *Ecol. Quest.* 14, 99–100.
- Vaultier, M.-N., Jolivet, Y., 2015. Ozone sensing and early signaling in plants: An outline from the cloud. *Environ. Exp. Bot.* 114, 144–152.
- Veljovic-Jovanovic, S., Noctor, G., Foyer, C.H., 2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiol. Biochem., Free radicals and oxidative stress in plants: A new insight* 40, 501–507.
- Violet-Chabrand, S., 2013. Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique: apport d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne. Université de Lorraine.
- Vingarzan, R., 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmos. Environ.* 38, 3431–3442.

- Vollenweider, P., Ottiger, M., Günthardt-Goerg, M.S., 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environ. Pollut.* 124, 101–118.
- Volz, A., Kley, D., 1988. Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the nineteenth century. *Nature* 332, 240–242.
- Vondráková, Z., Krajňáková, J., Fischerová, L., Vágner, M., Eliášová, K., 2016. Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. *Veg. Propag. For. Trees* 123–169.
- Walter, J., Jentsch, A., Beierkuhnlein, C., Kreyling, J., 2013. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environ. Exp. Bot.* 94, 3–8.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M., Dong, X., 2005. Induction of Protein Secretory Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. *Science* 308, 1036–1040.
- Wang, F.-F., Lian, H.-L., Kang, C.-Y., Yang, H.-Q., 2010. Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 3, 246–259.
- Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F., Shu, H., 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiol. Biochem.* 51, 81–89.
- Wasternack, C., Kombrink, E., 2009. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2*. Springer New York, New York, NY.
- Wildhagen, H., Paul, S., Allwright, M., Smith, H.K., Malinowska, M., Schnabel, S.K., Paulo, M.J., Cattonaro, F., Vendramin, V., Scalabrin, S., Janz, D., Douthe, C., Brendel, O., Buré, C., Cohen, D., Hummel, I., Le Thiec, D., van Eeuwijk, F., Keurentjes, J.J.B., Flexas, J., Morgante, M., Robson, P., Bogeat-Triboulot, M.-B., Taylor, G., Polle, A., 2018. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree Physiol.* 38, 320–339.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2009. Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell Environ.* 32, 949–959.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ.* 33, 510–525.
- Winwood, J., Pate, A.E., Price, A.J., Hanke, D.E., 2007. Effects of Long-Term, Free-Air Ozone Fumigation on the Cytokinin Content of Mature Beech Trees. *Plant Biol.* 9, 265–278.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant Cell Environ.* 30, 1150–1162.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Naidu, S.L., Karnosky, D.F., Long, S.P., 2009. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 15, 396–424.
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. A Receptor for Auxin. *Plant Cell Online* 17, 2425–2429.
- Wujeska, A., Bossinger, G., Tausz, M., 2013. Responses of foliar antioxidative and photoprotective defence systems of trees to drought: a meta-analysis. *Tree Physiol.* 33, 1018–1029.
- Yang, F., Xu, X., Xiao, X., Li, C., 2009. Responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Biol. Plant.* 53, 511–516.

- Yannarelli, G.G., Fernández-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L., 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 505–512.
- Young, P.J., Archibald, A.T., Bowman, K.W., Lamarque, J.-F., Naik, V., Stevenson, D.S., Tilmes, S., Voulgarakis, A., Wild, O., Bergmann, D., others, 2013. Pre-industrial to end 21st century projections of tropospheric ozone from the Atmospheric Chemistry and Climate Model Intercomparison Project (ACCMIP). *Atmospheric Chem. Phys.* 13, 2063–2090.
- Zechmann, B., 2011. Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 360–363.
- Zechmann, B., 2014. Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Front. Plant Sci.* 5, 1–11.
- Zechmann, B., 2017. Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxid. Redox Signal.* 29.
- Zhang, J., Gao, F., Jia, H., Hu, J., Feng, Z., 2018. Molecular response of poplar to single and combined ozone and drought. *Sci. Total Environ.*
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W., Song, C.-P., 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 126, 1438–1448.
- Zhang, Y., Cooper, O.R., Gaudel, A., Thompson, A.M., Nédélec, P., Ogino, S.-Y., West, J.J., 2016. Tropospheric ozone change from 1980 to 2010 dominated by equatorward redistribution of emissions. *Nat. Geosci.* 9, 875–879.
- Zhou, P., Ganzeveld, L., Rannik, Ü., Zhou, L., Gierens, R., Taipale, D., Mammarella, I., Boy, M., 2017. Simulating ozone dry deposition at a boreal forest with a multi-layer canopy deposition model. *Atmospheric Chem. Phys.* 17, 1361–1379.
- Zhou, R., Cutler, A.J., Ambrose, S.J., Galka, M.M., Nelson, K.M., Squires, T.M., Loewen, M.K., Jadhav, A.S., Ross, A.R.S., Taylor, D.C., Abrams, S.R., 2004. A New Abscisic Acid Catabolic Pathway. *Plant Physiol.* 134, 361–369.

# **Annexe**

---



## Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions



Elisa Pellegrini<sup>a</sup>, Yasutomo Hoshika<sup>b</sup>, Nicolas Dusart<sup>c</sup>, Lorenzo Cotrozzi<sup>a</sup>, Joëlle Gérard<sup>c</sup>, Cristina Nali<sup>a,\*</sup>, Marie-Noëlle Vaultier<sup>c</sup>, Yves Jolivet<sup>c</sup>, Giacomo Lorenzini<sup>a</sup>, Elena Paoletti<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Agriculture, Food and Environment, University of Pisa, Via del Borghetto 80, Pisa, 56124, Italy

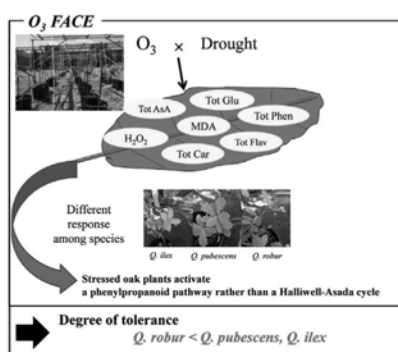
<sup>b</sup> Institute for Sustainable Plant Protection, National Research Council, Via Madonna del Piano 10, Sesto Fiorentino, Florence 50019, Italy

<sup>c</sup> Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, UMR Silva, 54000 Nancy, France

### HIGHLIGHTS

- Detoxification mechanisms at the basis of the high plasticity of oak species
- Ozone and drought had antagonistic effects on biochemical traits.
- Intrinsic physiological and biochemical mechanisms contribute to stress tolerance.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2018

Received in revised form 26 July 2018

Accepted 29 July 2018

Available online 31 July 2018

#### Keywords:

Climate change  
Oxidative damage  
Reactive oxygen species  
Detoxification  
Phenylpropanoids  
Halliwell-Asada cycle

### ABSTRACT

Plants are frequently exposed to adverse environmental conditions such as drought and ozone (O<sub>3</sub>). Under these conditions, plants can survive due to their ability to adjust their metabolism. The aim of the present study was to compare the detoxification mechanisms of three oak species showing different O<sub>3</sub> sensitivity and water use strategy. Two-year-old seedlings of *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* were grown under the combination of three levels of O<sub>3</sub> (1.0, 1.2 and 1.4 times the ambient O<sub>3</sub> concentration) and three levels of water availability (on average 100, 80 and 42% of field capacity i.e. well-watered, moderate drought and severe drought, respectively) in an O<sub>3</sub> Free Air Controlled Exposure facility. Ozone and drought induced the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and this phenomenon was species-specific. Sometimes, ROS accumulation was not associated with membrane injury suggesting that several antioxidative defence mechanisms inhibited or alleviated the oxidative damage. Both O<sub>3</sub> and drought increased total carotenoids that were able to prevent the peroxidation action by free radicals in *Q. ilex*, as confirmed by unchanged malondialdehyde by-product values. The concomitant decrease of total flavonoids may be related to the consumption of these compounds by the cell to inhibit the accumulation of hydrogen peroxide. Unchanged total phenols confirmed that *Q. ilex* has a superior ability to counteract oxidative conditions. Similar responses were found in *Q. pubescens*, although the negative impact of both factors was less efficiently faced than in the sympatric *Q. ilex*. In *Q. robur*, high O<sub>3</sub> concentrations and severe drought induced a partial rearrangement of the phenylpropanoid pathways. These antioxidative mechanisms were not able to protect the cell structure (as confirmed by ROS accumulation) suggesting that *Q. robur* showed a lower degree of tolerance than the other two species.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [cristina.nali@unipi.it](mailto:cristina.nali@unipi.it) (C. Nali).

## 1. Introduction

Evidence for changing climate, associated with higher atmospheric concentrations of greenhouse gases, continues to increase. The years 2014 and 2015 are currently considered the warmest years in Europe since instrumental records began, i.e. >1.1 °C warmer than the pre-industrial level (EEA, 2017). For these years, the exceptional heat covered the whole summertime with mean precipitation (June to August) significantly decreased by up to 20 mm per decade. The series of summer heatwaves affecting Europe since 2003 has also contributed to several intense tropospheric ozone (O<sub>3</sub>) episodes. In 2015, 18 of the 28 states of the European Union (EU) and four other European countries outside the EU registered concentrations above the EU O<sub>3</sub> target value for the protection of human health (EEA, 2017).

Due to favorable meteorological conditions, both drought and O<sub>3</sub> are very likely to occur simultaneously. As a general rule, seasonal drought is typically associated with high insolation, and such conditions are conducive to the photo-oxidative formation of high O<sub>3</sub> levels (Butkovic et al., 1990). In addition, a rise in temperature significantly increases the emission rates of most biogenic volatile organic compounds that can contribute to O<sub>3</sub> production (Avery, 2006). Under drought, plants usually suffer from the impairment of many physiological and biochemical processes, such as (i) alteration of photosynthetic performance, (ii) cell dehydration, (iii) high production of reaction oxygen species (ROS) and, finally, (iv) early senescence and/or leaf necrosis (Chaves et al., 2003). Similar effects have also been attributed to O<sub>3</sub> (Cotrozzi et al., 2017a; Jolivet et al., 2016). A combination of drought and O<sub>3</sub> can induce responses considerably different from those observed when each stressor is applied independently (Bohler et al., 2015). Interestingly, the effects of drought and O<sub>3</sub> can be antagonistic, so that a simultaneous occurrence may be partially beneficial to plants. The most common combined response, in fact, is that drought mitigates the negative effects of O<sub>3</sub>, basically by closing stomata and thus reducing O<sub>3</sub> uptake into the plant (Pollastrini et al., 2013; Gao et al., 2017). However, other results suggest that drought can exacerbate O<sub>3</sub> damage: Alonso et al. (2014) reported that the combination of both stressors caused further decreases in accumulated aboveground biomass in two subspecies of *Quercus ilex*. It appears that the combination of drought and O<sub>3</sub> is highly dependent on (i) the severity and length of occurrence of both stress factors and (ii) the balance between stomatal O<sub>3</sub> uptake (i.e., Phytotoxic O<sub>3</sub> Dose, POD) and detoxification capacity of foliar cells (Dizengremel et al., 2013; Bohler et al., 2015).

Some studies have investigated the effects of combined drought and O<sub>3</sub> exposure on plant metabolism, especially in trees (see also Pollastrini et al., 2013; Cotrozzi et al., 2016; Yuan et al., 2016; Gao et al., 2017; Cotrozzi et al., 2017b). However, none of them investigated antioxidant molecules and/or physiological mechanisms. Whereas O<sub>3</sub> itself induces production of ROS and leads to a strong ROS accumulation, physiological responses to drought mostly use ROS as internally produced signalling molecules (Reddy et al., 2004), and severe drought may lead to photo-oxidative stress (Czarnocka and Karpiński, 2018). Consequently, accumulation of ROS is likely to be considerably higher during O<sub>3</sub> stress, and more closely located to chloroplasts under drought stress. Recently, Cotrozzi et al. (2017b) documented that hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) were directly involved in the O<sub>3</sub>-oxidative burst induced by an intense episode of O<sub>3</sub> exposure (200 ppb for 5 h) in three-year-old *Q. ilex* saplings. By contrast, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content did not change in plants subjected to drought (20% of the effective daily evapotranspiration, for 15 days). Such differences in ROS extent dynamics in relation to the stress factor suggested a complex network of events in signal transduction, involving other molecules (e.g., salicylic and jasmonic acid) and processes (e.g., proline biosynthesis).

Oaks (belonging to the genus *Quercus*) are widely distributed trees within the Mediterranean area and are able to cope with several environmental stressors due to the high plasticity of their phenotypic and physiological traits (Cotrozzi et al., 2016). Holm oak (*Q. ilex*) is likely

the most widely studied Mediterranean evergreen tree species and has been defined as “drought avoidant” (Bussotti et al., 2002) and “O<sub>3</sub>-tolerant” (Cotrozzi et al., 2018a; Hoshika et al., 2018). Downy oak (*Q. pubescens*) is a typical Mediterranean deciduous tree distributed in Southern Europe and has been defined as “drought-” (Curtu et al., 2011) and “O<sub>3</sub>-tolerant” (Cotrozzi et al., 2018a; Hoshika et al., 2018). Pedunculate oak (*Q. robur*) is one of the basic species in deciduous broadleaved forests of Europe and has been defined as “moderately drought-tolerant” (Vranckx et al., 2014) and “O<sub>3</sub>-sensitive” (Hoshika et al., 2018).

The aim of the present study was to assess the combined effects of drought and O<sub>3</sub> exposure on the antioxidant metabolism of three oak species showing different water use strategies and O<sub>3</sub> sensitivities, exposed for one growing season to three levels of water availability and three levels of O<sub>3</sub> in an O<sub>3</sub> Free Air Controlled Exposure (FACE) facility. Specifically, we asked the following questions: (i) How much ROS are induced by realistic O<sub>3</sub> and water stress levels? (ii) Which antioxidant mechanisms are activated in response to individual stresses and to the combination of the stressors at different intensities? (iii) Are metabolic responses markedly species-specific? (iv) Are antioxidative metabolism and stomatal uptake of O<sub>3</sub> correlated? We postulated a protective effect of drought against O<sub>3</sub> and that the interactive effects of both factors may depend on plant species. In particular, we hypothesized that the evergreen tree species (which usually inhabits limiting environments) will have a greater tolerance to drought and O<sub>3</sub> exposure than the deciduous ones (characterized by shorter leaf lifespan), due to its stronger need to protect its long-lived leaves from different environmental cues. In a previous work, Cotrozzi et al. (2016) demonstrated that *Q. ilex* was able to successfully cope with several stressors due to the high plasticity of morpho-anatomical, physiological and biochemical traits.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and experimental design

At the beginning of autumn 2014, two-year-old saplings of *Q. ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* were transferred from nearby nurseries to the O<sub>3</sub>-FACE facility of Sesto Fiorentino, Florence, Italy (43°48′59″N, 11°12′01″E, 55 m a.s.l.), where the experimental activities were conducted. The plants were established into 10-L pots containing peat:sand:nursery soil (1:1:1 in volume) and maintained under field conditions until the beginning of the treatment. Uniform-sized plants were selected and grown under the combination of three levels of O<sub>3</sub> (1.0, 1.2 and 1.4 times the ambient air concentration, denoted as AA, 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively) and three levels of water irrigation [100, 80 and 42% of field capacity on average, denoted as WW (well watered), MD (moderate drought) and SD (severe drought), respectively] from 1st June to 15th October 2015 (4.5 months). A detailed description of the O<sub>3</sub> exposure methodology is available in Paoletti et al. (2017). The maximum hourly ozone concentrations were 93 ppb in AA, 111 ppb in 1.2 × AA and 123 ppb in 1.4 × AA, respectively, throughout the experimental period. AOT40 (Accumulated exposure Over Threshold of 40 ppb) values during the experimental period were 17.8 ppm h, 29.7 ppm h and 40.3 ppm h in AA, 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively. Biomass results from this experiment were used for assessing O<sub>3</sub> risk in a previous paper (Hoshika et al., 2018), where further details on O<sub>3</sub> metrics are also available. The amount of irrigation was related to the soil field capacity, i.e. the maximum volume of water that was retained into the soil of the pots [volumetric soil water content was measured in the root layer by EC-5 soil moisture sensors equipped with an EM5b data logger, (Decagon Devices, Pullman, WA, USA), Hoshika et al. (2018)]. Three replicated plots (5 × 5 × 2 m) were assigned to each O<sub>3</sub> treatment, with three plants per each combination of species, O<sub>3</sub> level and water irrigation. At the end of the experiment, the first mature (fully expanded) top leaves of all three plants per plot (one leaf with 5th to 8th order per plant) in each O<sub>3</sub> × irrigation



treatment were gathered, divided into aliquots (obtained from each combination of species, O<sub>3</sub> level and water irrigation per plot), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until biochemical analyses were done. Sampling was performed from 11:00 am to 1:00 pm.

## 2.2. Oxidative damage and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content

Oxidative damage to membranes was estimated in terms of lipid peroxidation by determining the malondialdehyde (MDA) by-product accumulation, according to the method of Guidi et al. (2017). Samples (40 mg fresh weight, FW) were extracted with 1 mL of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid. The determination was performed with a spectrophotometer (6505 UV-Vis, Jenway, UK) at 532 and 600 nm.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was measured fluorometrically using the Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to Cotrozzi et al. (2017b). Samples (30 mg FW) were extracted with 800 µL of 20 mM potassium-phosphate (K-P) buffer (pH 6.5). The determination was performed with a fluorescence/absorbance microplate reader (Victor3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) at 530 and 590 nm (excitation and emission of resorufin fluorescence, respectively).

## 2.3. Pigments

Pigments were assessed according to Cotrozzi et al. (2017b), with minor modifications. Samples (30 mg FW) were homogenized in 1 mL of 100% HPLC-grade methanol and incubated overnight at 4 °C in the dark. High Performance Liquid Chromatography (HPLC; P680 Pump, UV170U UV-VIS detector, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) separation was performed at room temperature with a reverse-phase Dionex column [Acclaim 120, C18, 5 µm particle size, 4.6 mm internal diameter (i.d.) 150 mm length]. A detailed description of analytical conditions is available in Cotrozzi et al. (2017b).

## 2.4. Metabolites involved in the Halliwell-Asada cycle

Contents of ascorbate and glutathione were assessed according to Davey et al. (2003), with minor modifications. Samples (100 mg FW) were extracted in 1 mL of chilled extraction buffer [6% metaphosphoric acid in 65% HPO<sub>3</sub> (w/v), pH 1.5] containing 2 mM EDTA and 1% polyvinylpyrrolidone (w/w). The supernatant was divided in order to determine the reduced form of ascorbate and glutathione (i.e. AsA and GSH, respectively) and the total pool of each component (total ascorbate and total glutathione). To determine total pools, extracts were mixed with 200 mM dithiothreitol in 2 M Tris base to reach a pH between 6.0 and 6.8. HPLC separation was performed on a Prominence Shimadzu system (LC-20AT pump, SPD-M20A diode array detector, Shimadzu, Tokyo, Japan) at 25 °C with a reverse-phase column (Kinetex EVO C18, 2.6 µm spherical particle size, 4.6 mm i.d., 100 mm length).

## 2.5. Metabolites involved in the phenylpropanoid pathway

Contents of phenylpropanoids were assessed according to Cotrozzi et al. (2018b), with some modifications. Samples (30 mg FW) were homogenized in 500 µL of 80% HPLC-grade methanol [in water (v/v)]. The supernatant was diluted five-fold with an aqueous solution of 0.2% formic acid. UHPLC-ESI-MS/MS analyses were performed on an Agilent 1290 Infinity II LC system coupled to a 6495 Triple Quadrupole mass spectrometer equipped with a Jet Stream electrospray (ESI) ionization source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The separation was achieved at 35 °C using a reverse-phase Agilent column (Zorbax Eclipse Plus, C18, 1.8 µm particle size, 2.1 mm i.d., 50 mm length). A detailed description of analytical conditions is available in Assumpção et al. (2018). In the present study, phenylpropanoid metabolites are

grouped and presented as total free phenolic acids (Tot Phen) and flavonoids (Tot flav) on the basis of their chemical structure.

## 2.6. Relationship of oxidative metabolism and stomatal ozone uptake (POD)

The O<sub>3</sub> dose during the experiment was calculated as the phytotoxic ozone dose (POD<sub>y</sub>) above an hourly stomatal uptake threshold of 0 nmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (POD<sub>0</sub>) determined for each oak species in our previous work (Hoshika et al. 2018), in order to assess relationships between the observed parameters of oxidative metabolism and stomatal O<sub>3</sub> uptake. POD<sub>0</sub> was calculated by considering species-specific stomatal responses to environmental stimuli according to the Manual on Methodologies and Criteria for Modelling and Mapping Critical Loads and Levels and Air Pollution Effects, Risks and Trends (CLRTAP, 2017). The details were described in Hoshika et al. (2018).

## 2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and JMP 11.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The statistical unit was the single plot, i.e. all leaves from the three plants per species in each plot were merged in a single sample per O<sub>3</sub> × irrigation replicate (N = 3 plots). Data for all biochemical parameters were tested with the Shapiro-Wilk *W* test for normality and with the Levene test for homogeneity of variance. All data were normally distributed and thus were analyzed by three-way ANOVA with O<sub>3</sub>, drought and species as fixed factors. Comparisons among means were determined by the Tukey HSD post-test. MDA data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-test. To determine whether O<sub>3</sub> and drought exerted additive, synergistic or antagonistic impacts on the traits, the observed (Obs) effects were compared with the expected (Exp) additive ones for each oak species exposed to both stressors, according to Bansal et al. (2013). When the difference between Obs and Exp was positive and the lower 95% confidence limit was greater than zero, the impact from the combined stressors was classified as “synergistic”. When the difference between Obs and Exp was negative and the upper 95% confidence limit was less than zero, the impact from the combined impact was classified as “antagonistic”. When the 95% confidence interval crossed the zero line, the impact was classified as “additive”. The relationships between oxidative metabolism and POD<sub>0</sub> of the three oak species were tested by a simple linear regression analysis, and species differences in statistically significant regressions were evaluated by analysis of covariance (ANCOVA).

## 3. Results

### 3.1. Oxidative damage and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content

For MDA, the interaction among O<sub>3</sub>, drought and species was not significant (Table 1, Fig. 1S). The effects of single factors and their interactions in all binary combinations (O<sub>3</sub> × drought; O<sub>3</sub> × species and drought × species) were significant. Ozone *per se* had a significant impact on MDA only in the deciduous species. In *Q. pubescens*, O<sub>3</sub> markedly increased the values of MDA, without significant differences between the two higher O<sub>3</sub> concentrations (one-way ANOVA with O<sub>3</sub> as factor: *P* ≤ 0.001). Only moderate O<sub>3</sub> concentrations induced an accumulation of MDA in *Q. robur* (one-way ANOVA with O<sub>3</sub> as factor: *P* ≤ 0.05). Drought *per se* had a significant impact on MDA only in the deciduous species. In *Q. pubescens*, drought markedly increased MDA, without significant differences between reduced water availability (one-way ANOVA with drought as factor: *P* ≤ 0.001). Only MD induced an accumulation of MDA in *Q. robur* (one-way ANOVA with drought as factor: *P* ≤ 0.05). *Q. ilex* displayed MDA values about 2-fold higher than the other species (one-way ANOVA with plant species as factor: *P* ≤ 0.001) and no effects of O<sub>3</sub> and drought were observed.

**Table 1**

P values of three-way ANOVA of the effects of ozone (O<sub>3</sub>), drought and plant species on malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), total carotenoids (Tot Car), total ascorbate (Tot AsA), total glutathione (Tot Glu), total phenolic acids (Tot Phen) and total flavonoids (Tot Flav). Asterisks show the significance of factors/interaction: \*\*\* P ≤ 0.001, \*\* P ≤ 0.01; ns P > 0.05. d.f. represents the degrees of freedom.

Effects	d. f.	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tot Car	Tot AsA	Tot GSH	Tot Phen	Tot Flav
O <sub>3</sub>	2	***	***	***	***	*	***	***
Drought	2	***	***	**	**	ns	ns	ns
Plant species	2	***	***	***	***	***	***	***
O <sub>3</sub> × drought	4	**	***	***	ns	ns	***	***
O <sub>3</sub> × plant species	4	**	***	***	ns	ns	***	***
Drought × plant species	4	***	***	***	*	ns	***	***
O <sub>3</sub> × drought × plant species	8	ns	***	***	ns	ns	***	***

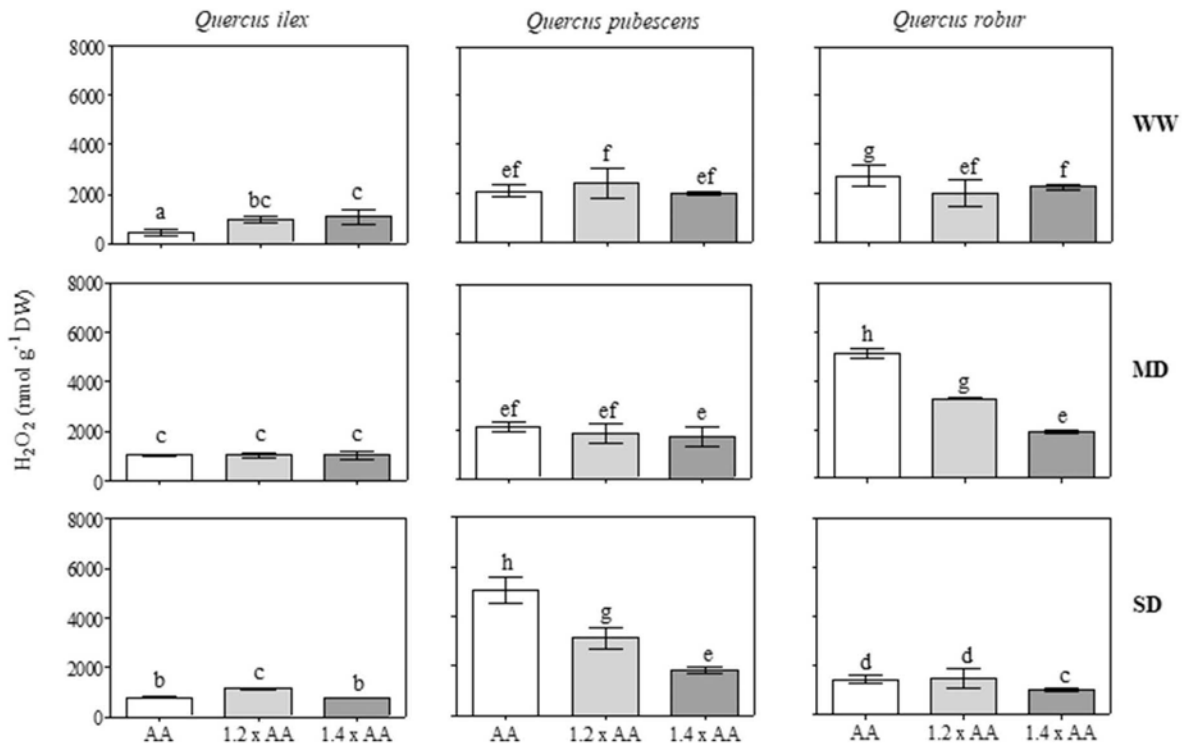
The effects of all combinations of O<sub>3</sub>, drought and species were significant for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 1, Fig. 1). O<sub>3</sub> *per se* increased the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Q. ilex* WW plants, without significant differences between the two higher O<sub>3</sub> concentrations (Fig. 1). Drought *per se* markedly increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Q. ilex* under AA conditions, with significant differences between reduced water availability (+127 and +74% under MD and SD conditions, compared to WW). *Q. pubescens* exhibited a SD-induced accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (about 2-fold higher than WW). Similarly, *Q. robur* exhibited a MD-induced accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (+89% compared to WW). Under AA-WW conditions, *Q. ilex* displayed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> values about 5-fold lower than the other species. Under combined conditions (O<sub>3</sub> and drought), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents remained unaltered in *Q. ilex* exposed to increasing O<sub>3</sub> levels, independently of the watering regimes, except for 1.2 × AA combined with SD (+44% in comparison to AA-SD).

Ozone and drought in combination had synergistic effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Q. ilex*, except when the higher O<sub>3</sub> concentrations and SD treatments were combined as in this case they acted antagonistically (Fig. 2A).

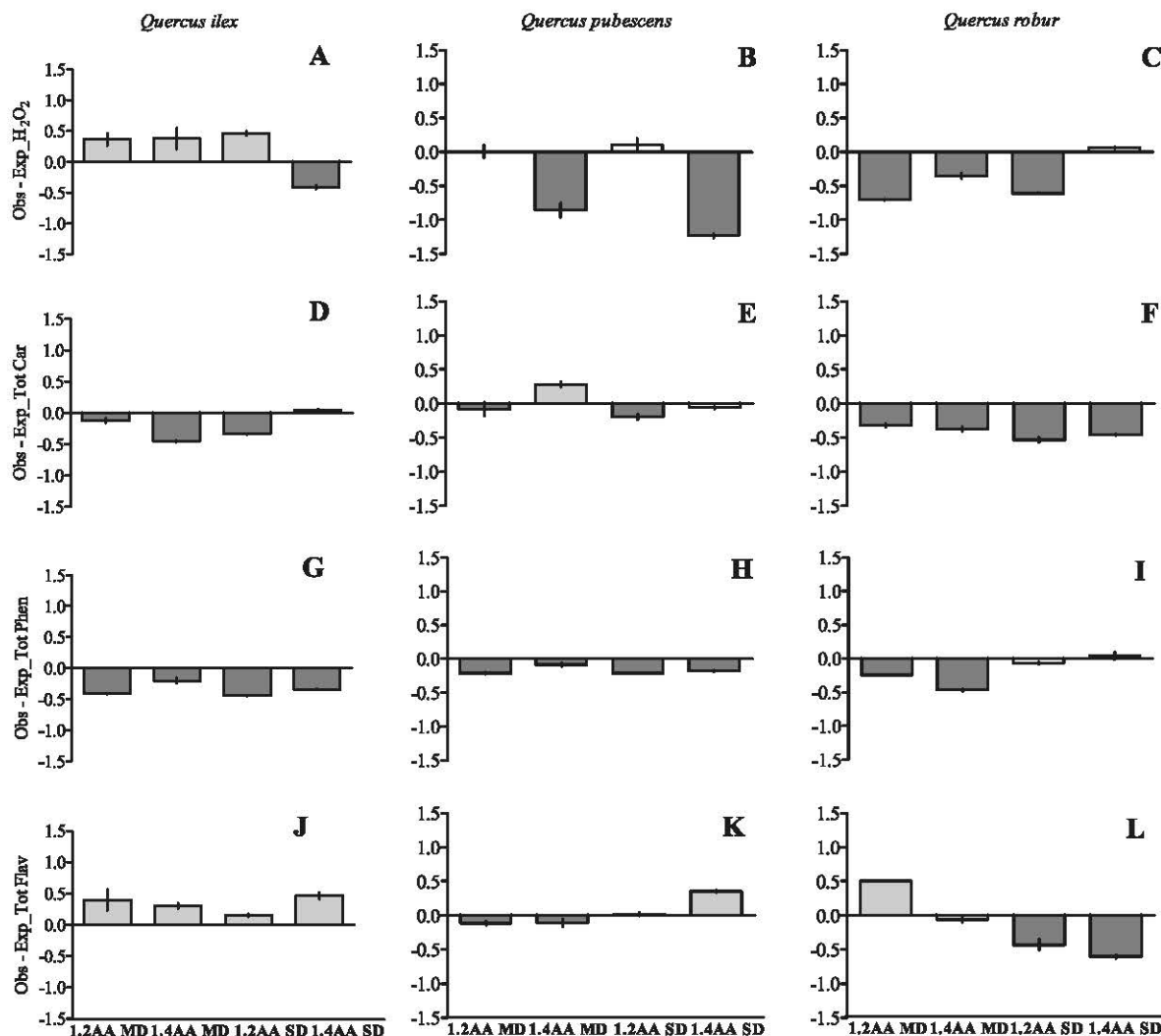
The two stressors generally had antagonistic effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content also in deciduous species (Fig. 2A–C). Weak additive effects, however, were found in *Q. pubescens* when moderate levels of O<sub>3</sub> were combined with SD, and in *Q. robur* exposed to the highest intensity of both stressors (Fig. 2B–C).

**3.2. Total carotenoids**

The effects of all combinations of O<sub>3</sub>, drought and species on total carotenoids (Tot Car) were significant (Table 1, Fig. 3). O<sub>3</sub> *per se* induced a slight accumulation of Tot Car in *Q. ilex* WW plants in comparison to AA ones, without significant differences between the higher O<sub>3</sub> concentrations. High O<sub>3</sub> concentrations decreased the content of Tot Car in *Q. pubescens* (–19% in comparison to AA conditions) and even more in *Q. robur*, with significant differences between increasing O<sub>3</sub> levels (–28 and –38% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). Drought *per se* also affected Tot Car in all species (except in *Q. ilex* under MD and in *Q. pubescens* under SD) in comparison to WW conditions. An SD-induced accumulation of Tot Car content occurred in *Q. ilex* (+45% compared to WW), while MD slightly decreased the levels of these metabolites in *Q. pubescens* (–18% in comparison to WW). Drought *per se* decreased Tot Car of *Q. robur*, with significant differences between drought regimes (–40 and –51% under MD and SD compared to WW). Under combined conditions (O<sub>3</sub> and drought), Tot Car content was significantly affected in all species exposed to the higher O<sub>3</sub> concentrations and subjected to reducing watering regimes in comparison to AA (except for *Q. ilex* MD plants). In particular, O<sub>3</sub> induced a decrease of Tot Car in *Q. ilex* and *Q. pubescens* SD plants, with significant differences between increasing O<sub>3</sub> levels (–23 and –82%, –26 and –12% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). An opposite trend of Tot Car was observed in *Q. pubescens* MD plants in response to increasing O<sub>3</sub> levels: –18 and +39% compared to AA ones (in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). An O<sub>3</sub>-induced accumulation of Tot Car was also observed in *Q. robur* MD and SD plants, with



**Fig. 1.** Hydrogen peroxide [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nmol g<sup>-1</sup> dry weight (DW)] in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves under free air O<sub>3</sub> exposure [applied for 4.5 months: ambient air (AA), 1.2 × and 1.4 × ambient O<sub>3</sub> (1.2 × AA and 1.4 × AA)] and subjected to different watering regimes [well-watered (WW), moderate drought (MD) and severe drought (SD)]. Data are shown as mean (n = 3) ± standard deviation. According to a three-way ANOVA with O<sub>3</sub>, drought and plant species as factors, different letters show significant differences among bars in the nine graphs (Tukey test, P ≤ 0.05).



**Fig. 2.** The combined impact of increasing ozone levels [applied for 4.5 months: 1.2 × and 1.4 × ambient air (1.2AA and 1.4AA)] and reducing water availability [moderate drought (MD) and severe drought (SD)] on hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , A–C), total carotenoids (Tot Car, D–F), total phenols (Tot Phen, G–I) and total flavonoids (Tot Flav, J–L) in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves. The bars represent the intensity-specific effect size difference (mean  $\pm$  95% confidence interval) between the observed (Obs) and expected (Exp) additive effects from the combination of the two stressors. The zero line represents the expected additive effects from combined stressors. When the means were greater than or less than the zero line, they were considered synergistic (gray bars) or antagonistic (dark gray bars; Bansal et al., 2013).

significant differences between increasing  $O_3$  levels (+27 and +81%, +157 and +55% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively).

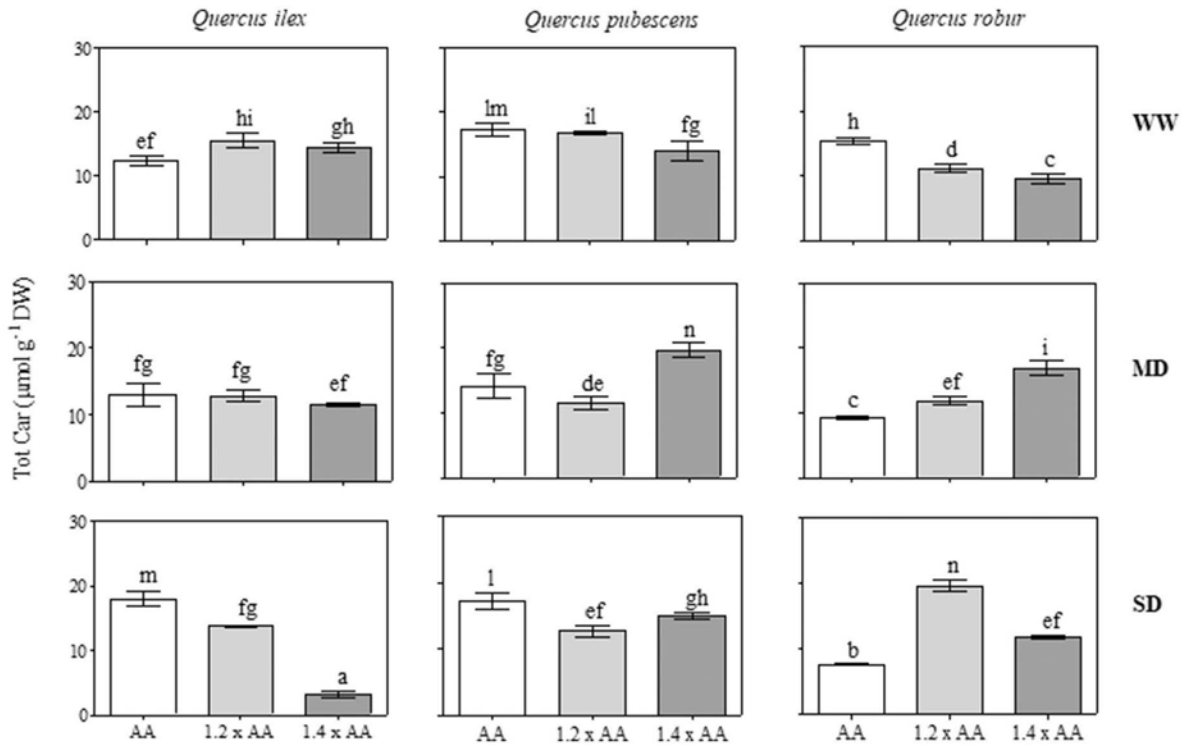
Ozone and drought in combination generally had antagonistic effects on Tot Car in all species (Fig. 2D–F). Additive effects were found in *Q. ilex* and in *Q. pubescens* when both stressors were of severe intensity. Synergistic effects were found only in *Q. pubescens* when high  $O_3$  concentrations and MD treatments were combined.

### 3.3. Metabolites involved in the Halliwell-Asada cycle and in the phenylpropanoid pathway

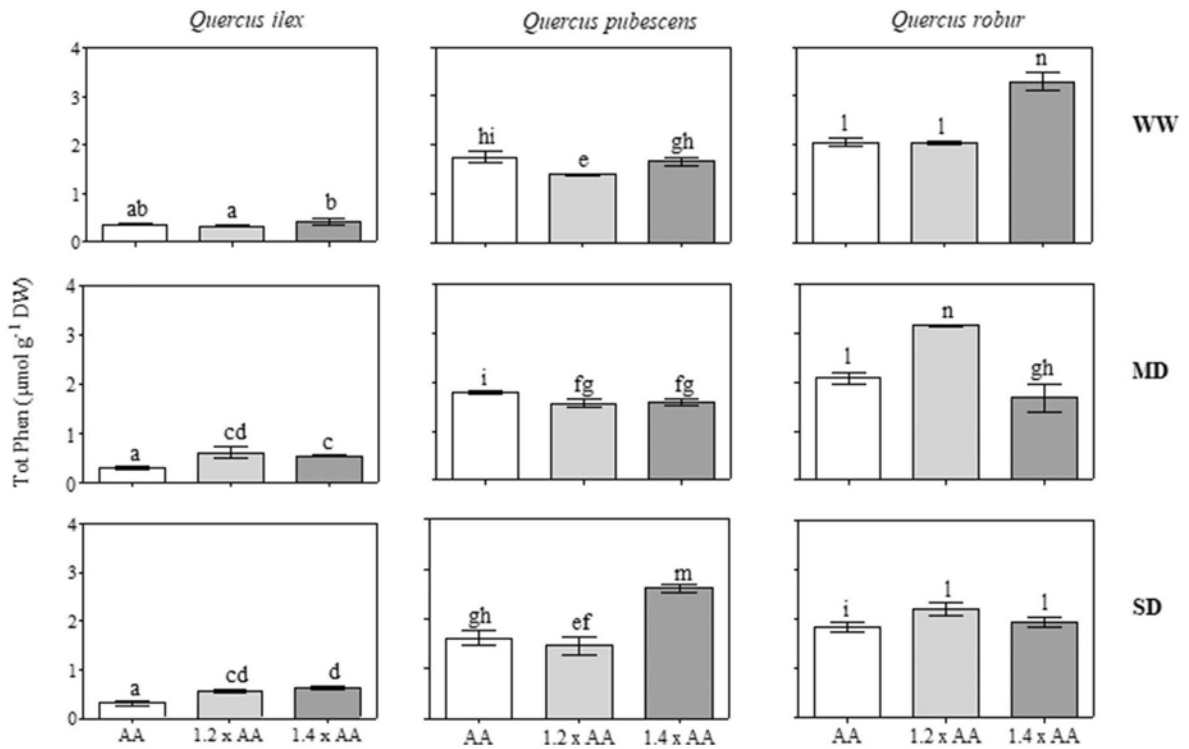
The three-way ANOVA test of total ascorbate (Tot AsA) and total glutathione (Tot Glu) content revealed that the interaction among  $O_3$ , drought and species was not significant (Table 1, Figs. 2S and 3S). The effects of single factors (except “drought” for Tot Glu) were significant. This was also true for the binary interaction “drought × species” in the case of Tot AsA.  $O_3$  *per se* had a significant impact on Tot AsA in all the three species under AA conditions. Only moderate  $O_3$  concentrations induced an accumulation of Tot AsA in *Q. ilex* (+21% in comparison to AA; one-way ANOVA with  $O_3$  as factor;  $P \leq 0.01$ ). Drought *per se* had a significant impact on Tot AsA only in *Q. robur*, with significant differences between reduced water availability (one-way ANOVA with drought as

factor;  $P \leq 0.001$ ). *Q. pubescens* displayed Tot AsA values about 2-fold lower than the other species (one-way ANOVA with plant species as factor;  $P \leq 0.01$ ). Ozone *per se* had a slight impact on Tot GSH only in *Q. pubescens* WW plants in comparison to AA ones: moderate  $O_3$  concentrations significantly increased Tot GSH content (+76%). Under AA-WW conditions, *Q. ilex* displayed Tot GSH values about 1.5-fold lower than the other species.

The three-way ANOVA test of Tot Phen and Tot Flav revealed that the interaction among  $O_3$ , drought and species, the effects of each factor (except drought) and their binary interactions were significant (Table 1). Ozone *per se* had a slight impact of Tot Phen only in the deciduous species. Moderate  $O_3$  concentrations negatively altered Tot Phen in *Q. pubescens* WW (−20% compared to AA, Fig. 4). High  $O_3$  concentrations significantly increased Tot Phen in *Q. robur* WW plants (+61 compared to AA). Drought *per se* did not alter Tot Phen in all species (except SD in *Q. robur*). Under AA-WW conditions, *Q. ilex* displayed Tot Phen values about 5-fold lower than the other species, with *Q. robur* showing slightly higher levels than *Q. pubescens*. Under combined conditions ( $O_3$  and drought), Tot Phen content was significantly affected in all species exposed to the higher  $O_3$  concentrations and subjected to reducing watering regimes in comparison to AA. In particular, *Q. ilex* exhibited an  $O_3$ -induced accumulation of Tot Phen under MD and SD conditions,



**Fig. 3.** Total carotenoid (Tot Car) content [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  dry weight (DW)] in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves under free air  $\text{O}_3$  exposure [applied for 4.5 months: ambient air (AA), 1.2  $\times$  and 1.4  $\times$  ambient  $\text{O}_3$  (1.2  $\times$  AA and 1.4  $\times$  AA)] and subjected to different watering regimes [well-watered (WW), moderate drought (MD) and severe drought (SD)]. Data are shown as mean ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. According to a three-way ANOVA with  $\text{O}_3$ , drought and plant species as factors, different letters show significant differences among bars in the nine graphs (Tukey test,  $P \leq 0.05$ ). Tot Car = neoxanthin + violaxanthin + antheraxanthin + lutein + zeaxanthin +  $\beta$ -carotene.



**Fig. 4.** Total free phenolic (Tot Phen) acid content [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  dry weight (DW)] in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves under free air  $\text{O}_3$  exposure [applied for 4.5 months: ambient air (AA), 1.2  $\times$  and 1.4  $\times$  ambient  $\text{O}_3$  (1.2  $\times$  AA and 1.4  $\times$  AA)] and subjected to different watering regimes [well-watered (WW), moderate drought (MD) and severe drought (SD)]. Data are shown as mean ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. According to a three-way ANOVA with  $\text{O}_3$ , drought and plant species as factors, different letters show significant differences among bars in the nine graphs (Tukey test,  $P \leq 0.05$ ). Tot Phen = caffeoyl-glucoside + chlorogenic acid + coumaric acid (only in deciduous species) + coumaroylquinic (only in deciduous species) + coumaroyl-glucoside + coumaroyl-glucoside 2 + cryptochlorogenic acid (only in *Q. pubescens*) + gallic acid + galloyl-glucoside + gentisic acid + neochlorogenic acid (only in deciduous species).

without significant differences between the higher O<sub>3</sub> concentrations. Ozone induced a decrease of Tot Phen in *Q. pubescens* MD plants, without significant differences between the higher O<sub>3</sub> concentrations. An opposite trend of Tot Phen was observed in *Q. pubescens* SD and *Q. robur* MD plants in response to increasing O<sub>3</sub> levels: −9 and +61%, +51 and −20% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively. Increasing O<sub>3</sub> levels combined with SD induced a slight increase of Tot Phen in *Q. robur*, without significant differences between the higher O<sub>3</sub> concentrations.

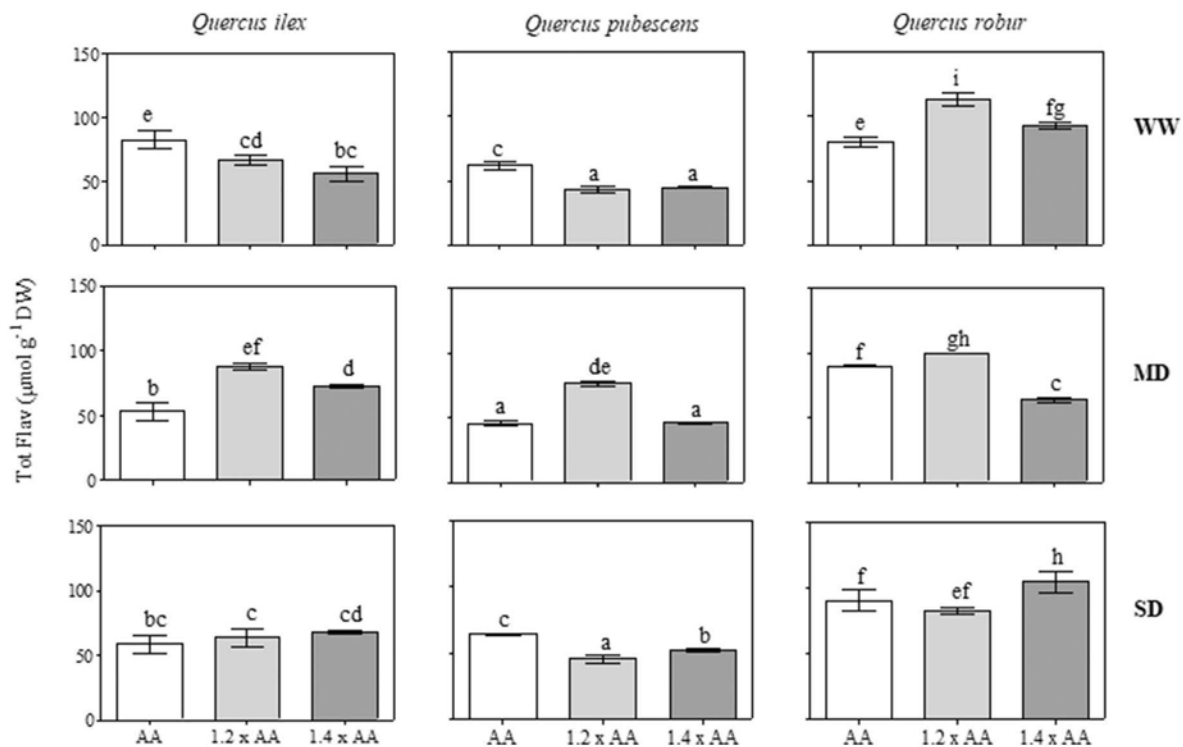
Ozone *per se* significantly affected the content of Tot Flav in all species; in particular, decreased Tot Flav in *Q. ilex* and *Q. pubescens* WW, without significant differences between the higher O<sub>3</sub> concentrations (Fig. 5). An O<sub>3</sub>-induced accumulation of Tot Flav was observed in *Q. robur* WW, with significant differences between O<sub>3</sub> treatments (+43 and +16% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). Drought *per se* significantly influenced Tot Flav in all species (except SD in *Q. pubescens*). Increasing severity of drought induced an evident decrease of Tot Flav in *Q. ilex* under AA, without significant differences between reducing water availability. An MD-induced reduction of Tot Flav was observed in *Q. pubescens* under AA conditions (−27% in comparison to WW). Drought *per se* induced a rise of Tot Flav in *Q. robur* under AA, without significant differences between O<sub>3</sub> levels. Under AA-WW conditions, *Q. pubescens* displayed lower Tot Flav values than the other species. Under combined conditions (O<sub>3</sub> and drought), Tot Flav were significantly affected in all species exposed to increasing O<sub>3</sub> concentrations, independently on the severity of drought (except in *Q. ilex* SD plants). *Q. ilex* MD plants exhibited an O<sub>3</sub>-induced increase of Tot Flav, with significant differences between O<sub>3</sub> levels (+66 and +37% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). Moderate O<sub>3</sub> concentrations markedly increased Tot Flav in *Q. pubescens* MD plants (+69% in comparison to AA ones). Increasing O<sub>3</sub> levels negatively affected Tot Flav in *Q. pubescens* SD plants, with significant differences between O<sub>3</sub> levels (−29 and −19% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively). An opposite

trend of Tot Flav was observed in *Q. robur* MD plants exposed to increasing O<sub>3</sub> levels: +11 and −29% in 1.2 × AA and 1.4 × AA, respectively. High O<sub>3</sub> levels slightly altered Tot Flav in *Q. robur* SD plants (+16% compared to AA).

Ozone and drought in combination generally had antagonistic effects on Tot Phen content in all species (Fig. 2G–I). Additive effects were found in *Q. robur* when moderate and high O<sub>3</sub> concentrations were in combination with SD (Fig. 2I). By contrast, O<sub>3</sub> and drought in combination generally had synergistic effects on Tot Flav content in *Q. ilex* (Fig. 2J). Antagonistic effects were found in the deciduous species when moderate and high O<sub>3</sub> concentrations were in combination with MD and SD treatments in *Q. pubescens* and *Q. robur*, respectively (Fig. 2J–L). Weak additive effects were found for Tot Flav in *Q. robur*, when high O<sub>3</sub> concentrations and MD treatments were combined (Fig. 2L).

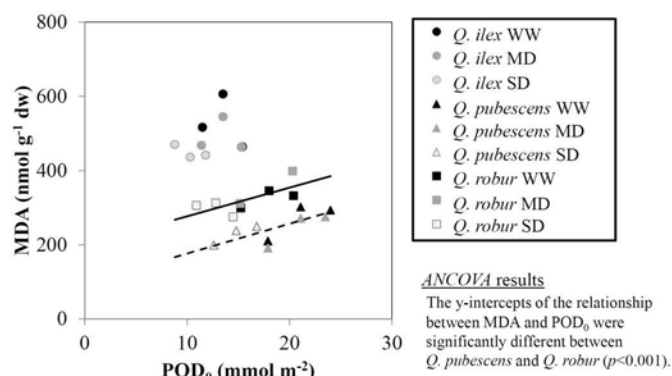
### 3.4. Relationship of oxidative metabolism and stomatal ozone uptake (POD)

Higher POD<sub>0</sub> was found in deciduous oaks (*Q. robur*: 10.9 to 20.4 mmol m<sup>−2</sup>; *Q. pubescens*: 12.6 to 24.0 mmol m<sup>−2</sup>) than evergreen oaks (*Q. ilex*: 8.8 to 15.4 mmol m<sup>−2</sup>) (Fig. 6). Soil water deficit limited POD<sub>0</sub> in all three oaks (25 to 30% limitation in SD treatments relative to WW treatments). No significant relationships were found between POD<sub>0</sub> and most of the parameters of oxidative metabolism (*i.e.*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tot Car, Tot Phen, Tot Flav, AsA, GSH) (*data not shown*). However, we found significant positive relationships between POD<sub>0</sub> and MDA for *Q. pubescens* and *Q. robur*, although such a relationship was not found in *Q. ilex* (Fig. 6). The intercepts of those relationships differed between *Q. pubescens* and *Q. robur* ( $P \leq 0.001$  by ANCOVA), while slopes were comparable ( $-8 \times 10^{-3}$  g DW m<sup>2</sup>).



**Fig. 5.** Total flavonoid (Tot Flav) content [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  dry weight (DW)] in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves under free air O<sub>3</sub> exposure [applied for 4.5 months: ambient air (AA), 1.2 × and 1.4 × ambient O<sub>3</sub> (1.2 × AA and 1.4 × AA)] and subjected to different watering regimes [well-watered (WW), moderate drought (MD) and severe drought (SD)]. Data are shown as mean ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. According to a three-way ANOVA with O<sub>3</sub>, drought and plant species as factors, different letters show significant differences among bars in the nine graphs (Tukey test,  $P \leq 0.05$ ). Tot Flav = catechin + epicatechin + epigallocatechin + hesperidin + isorhamnetin-glucoside + isorhamnetin-rutinoside + kaempferol (only in *Q. robur*) + kaempferol-glucoside + kaempferol-rutinoside + phloridzin + procyanidin B1 + pelargonidin-rutinoside + quercetin + quercetin arabinoside + quercetin-galactoside + quercetin-galloyl-glucoside + quercetin-glucoside + quercetin-rhamnoside + quercetin-xyloside + rhamnetin-glucoside + rutin.





**Fig. 6.** Relationships between phytotoxic  $O_3$  dose ( $POD_0$ ,  $mmol\ m^{-2}$ ) and malondialdehyde (MDA,  $nmol\ g^{-1}$  dry weight (DW)) in *Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur* leaves under free air  $O_3$  exposure [applied for 4.5 months: ambient air (AA),  $1.2 \times$  and  $1.4 \times$  ambient  $O_3$  ( $1.2 \times$  AA and  $1.4 \times$  AA)] and subjected to different watering regimes [well-watered (WW), moderate drought (MD) and severe drought (SD)]. Significant relationships were found in *Q. pubescens* (dotted line,  $y = 8.05x + 95.74$ ,  $R^2 = 0.58$ ,  $P < 0.05$ ) and *Q. robur* (black line,  $y = 7.72x + 199.49$ ,  $R^2 = 0.50$ ,  $P < 0.05$ ), while no significant regression was found in *Q. ilex* ( $y = 6.21x + 413.15$ ,  $R^2 = 0.06$ ,  $P = 0.52$ ). The y-intercepts were significantly different between *Q. pubescens* and *Q. robur* by an ANCOVA test ( $P < 0.001$ ). ns denotes not significant.

#### 4. Discussion

Plants are frequently exposed to adverse environmental conditions such as drought and  $O_3$ . Under these conditions, plants can survive thanks to the ability to adjust their metabolism to cope with these stressors (Noctor et al., 2018). Much progress has been made in understanding the dual role of ROS in plant biology. ROS are required for many important signalling reactions, but are also toxic by-products of aerobic metabolism. This dual role is mainly dependent on (i) their concentration, (ii) site and duration of their action, (iii) occurrence of previous stress events and (iv) concurrence of other constrained conditions (Noctor et al., 2018). At high concentrations, ROS pose a significant threat that may eventually lead to programmed cell death (PCD). At low doses, ROS are employed as signals that mediate at least part of the responses towards stress. ROS production is a common feature under abiotic stress conditions (Foyer and Noctor, 2011).

ROS accumulation can also be due to  $O_3$  degradation into the leaf tissues (Czarnocka and Karpiński, 2018). Drought response mostly uses ROS as internally produced signalling molecules, although severe drought may lead to photo-oxidative stress (Reddy et al., 2004). Recent evidence shows that when subjected to a combination of multiple stresses, plants respond differently relative to when they experience only a single type of stress (Cotrozzi et al., 2017b). Therefore, the first question we wanted to address for the three species investigated in the present study was “How much ROS are induced by realistic  $O_3$  and water stress levels?” The impact of  $O_3$  *per se* on ROS production appeared to be species-specific in view of the accumulation of  $H_2O_2$  observed only in *Q. ilex*, where however the basal levels of this ROS were lower compared to the deciduous species, likely due to a balancing relation with other ROS (e.g., anion superoxide, hydroxyl radical; Foyer and Noctor, 2011). The induction of an oxidative burst by the two higher  $O_3$  concentrations, however, was not associated with membrane injury (as demonstrated by the unchanged MDA by-product values). This result suggests that an activation of an efficient free radical scavenging system minimized the adverse effects of a general peroxidation, thus contributing to (i) the maintenance of membrane structure and integrity and (ii) the delay of leaf senescence (Miller et al., 1999).

Peroxidation control and cell membrane stability under increased ROS conditions are usually characteristic of  $O_3$ -tolerant plants, which are able to cope with ROS by the activation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds (Gill and Tuteja, 2010). In contrast, the deciduous species increased MDA under  $O_3$  as  $H_2O_2$  likely reacted

with some cell wall and plasma membrane components, which resulted in lipid peroxidation (Czarnocka and Karpiński, 2018). Drought *per se* also induced a similar  $H_2O_2$  accumulation in *Q. ilex*, but again, the maintenance of membrane functionality (i.e., unchanged MDA by-product values) suggests that a tight control of ROS production occurred. In particular,  $H_2O_2$  may be involved in the integration of cellular processes and in the adaptation to environmental stimuli (Dizengremel et al., 2013). The reducing water availability had a strong impact on the deciduous species. A marked over-production of  $H_2O_2$  was observed in *Q. pubescens* SD and *Q. robur* MD plants and it was associated with membrane denaturation. This result suggests that oxidative damage occurred, probably due to an inadequate response of the antioxidative systems (Czarnocka and Karpiński, 2018).

In light of the above, the second question was “Which antioxidant mechanisms are activated in response to individual stresses and to the combination of the stressors at different intensities?” It is known that leaf biochemical traits (e.g., Car, AsA, GSH, Phen, Flav) are crucial for avoiding and preventing oxidative damage during stress conditions (Sharma et al., 2012). Our results suggest that the oxidative damage induced by the higher  $O_3$  concentrations and the reduced water availability (single or in combination) only slightly modified the pool (and the reduction level) of the metabolites involved in the Halliwell-Asada cycle. Only  $O_3$  *per se* increased the total abundance of intracellular AsA in all the three species under AA conditions, confirming that AsA represents the first line of defence against  $O_3$ -oxidative load (Conklin and Barth 2004). Particularly, a special role could be attributed to the apoplastic ascorbate. This fraction could contribute to differences in  $O_3$  tolerance for *Quercus* species as shown for other species (Burkey et al., 2000; Feng et al., 2010). However, AsA did not seem to be sufficient to mitigate the negative effects of  $O_3$  in terms of ROS production (in *Q. ilex*) and membrane denaturation (in *Q. pubescens* and *Q. robur*), suggesting that it may be more important in terms of regulation than in redox homeostasis (Foyer and Noctor, 2011). This is probably because AsA is a cofactor of several plant-specific enzymes that are involved in important pathways leading to the biosynthesis of (i) cell wall hydroxyproline-rich proteins, (ii) defence-related secondary metabolites and (iii) plant hormones (Gest et al., 2013). Our results indicate that the phenylpropanoid pathway (including non-volatile isoprenoids such as carotenoids) was very responsive in stressed plants.

It is known that Car are liposoluble antioxidants that play several functions in plant metabolism including oxidative stress tolerance (Havaux et al., 2005). They serve an important photoprotective role by dissipating excess excitation energy as heat or by scavenging ROS and suppressing lipid peroxidation (Gill and Tuteja, 2010). Consequently, Car can transiently complement the action of the primary antioxidants (i.e., AsA and enzymatic antioxidant compounds, Brunetti et al., 2015). Secondary metabolites (such as phenols and flavonoids) are well suited to constitute a “secondary” antioxidant system with a central role in plant defence against severe constraints by avoiding the generation of ROS and by quenching ROS once they are formed (Brunetti et al., 2015). For all the three species tested in this work, it is possible to conclude that distinct phenylpropanoid pathways were activated in response to  $O_3$  and drought, when applied singularly. Ozone and drought in combination generally had antagonistic effects on most biochemical traits. This was most evident for Tot Car in *Q. ilex* (except when both stressors were of severe intensity) and *Q. robur*, and for Tot Phen in *Q. ilex* and *Q. pubescens*, as well as for ROS production, in which the accumulation of  $H_2O_2$  in *Q. ilex* and *Q. pubescens* under  $1.4 \times$  AA-SD conditions was not as severe as expected. However, Tot Flav (the most representative class of phenylpropanoid compounds) was affected by both stressors in *Q. ilex* (at different intensities) and in *Q. pubescens* and *Q. robur* under both  $1.4 \times$  AA-SD and  $1.2 \times$  AA-MD conditions, by exhibiting relatively strong and synergistic effects relative to their combined impact. It is possible to hypothesize that the strong decrease of Tot Phen could be related to the consumption of these compounds by the cell to counteract the accumulation of  $H_2O_2$ , thus representing an

important defence mechanism against the increased oxidative metabolism induced by reduced water availability. This result confirms that Tot Flav can be considered as a robust biochemical trait to improve the adaptability of plants to harsh environments. However, this mechanism appeared to be species-specific and depended on the so-called “metabolic plasticity” (Logemann et al., 2000).

In light of the above, the third question was “Are metabolic responses markedly species-specific”? In *Q. ilex*,  $O_3$  *per se* induced an increase of Tot Car that inhibited and/or prevented the peroxidation action of free radicals, as confirmed by unchanged MDA by-product values. The concomitant decrease of Tot Flav could be related to the consumption of these compounds by the cell to counteract the accumulation of  $H_2O_2$ , thus representing an important defence mechanism against the increased oxidative metabolism induced by  $O_3$  (Pellegrini et al., 2018). The unchanged Tot Phen values confirmed that *Q. ilex* can be considered  $O_3$ -tolerant according to the evidence that the biosynthesis of phenylpropanoids increases more in stress-sensitive than in tolerant species (Fini et al., 2012; Cotrozzi et al., 2018b). Drought *per se* did not give rise to the same effects induced by  $O_3$  confirming that the biochemical features found in *Q. ilex* are enough to explain its superior ability to counteract unfavorable environmental conditions, also in terms of the reducing water availability. In *Q. pubescens*, high  $O_3$  concentrations *per se* induced a concomitant reduction of Tot Car and Tot Flav suggesting that these antioxidants could be consumed by the cell to counteract the possible ROS generation due to increased oxidative metabolism and cellular damages. It is known that Car and Flav are involved in non-photochemical quenching mechanisms, thus reducing the risk of photo-oxidative stress (Niinemets et al., 2003). Based on relative physical-chemical features and intra-cellular distribution, they may serve distinct and complementary functions (Close and Beadle, 2003). Consequently, the utilization of these compounds could improve the tolerance of *Q. pubescens* to  $O_3$ , as confirmed by the unchanged Tot Phen values. For this species, moderate drought *per se* did not give rise to the same effects induced by  $O_3$ . This result confirms that the biochemical features found in *Q. pubescens* increased the ability of cells to scavenge stress-derived ROS, but they counteracted the negative impact of both stressors (at different intensities) less efficiently than in the sympatric *Q. ilex*. In *Q. robur*, high  $O_3$  concentrations *per se* induced a partial rearrangement of the phenylpropanoid pathways with different functions in order to alleviate the excess of excitation pressure and to provide antioxidative protection to chloroplasts.

Phenylpropanoid pathways contribute to all aspects of plant responses towards biotic and abiotic stimuli (Vogt, 2010). Generally, the increase in phenylpropanoid concentration can be considered a repair process that can equip stressed plants with an additional antioxidant system capable of avoiding and scavenging ROS (Cotrozzi et al., 2018b). It is possible to conclude that the reduction of Tot Car and the concomitant increase of Tot Flav were not enough to counteract and/or reduce the photo-oxidative stress induced by high  $O_3$  concentrations. The concomitant induction of Tot Phen would indicate a better capacity to regulate the level of ROS, and hence the cellular redox state. However, these additional antioxidative mechanisms were not able to protect and/or repair the cell structure and to prevent the occurrence of the oxidative load (as confirmed by the increase of MDA by-products values). Severe drought *per se* did not give rise to the same effects induced by high  $O_3$  concentrations confirming that *Q. robur* is least adapted to unfavorable environmental conditions because of a lower degree of tolerance compared with the other two species. Even though no clear relationship between the activation of phenylpropanoids and stress tolerance has been established, it is known that the biosynthesis of these secondary metabolites increases more in stress-sensitive than in tolerant species (Fini et al., 2012). The variation in  $O_3$ -sensitivity among the three species tested in this work can be ascribed not only to the ability of cells to scavenge  $O_3$ -derived ROS and to raise detoxifying barriers, but also to the stomatal  $O_3$  uptake. According to Reich (1987), cell fate in an  $O_3$ -polluted environment depends on exposure, uptake and

biological responses, so a powerful tool to estimate plant susceptibility to  $O_3$  should take into account both cellular biochemical defenses and  $O_3$  flux through stomata.

In light of the above, the fourth question was “Are oxidative metabolism and stomatal uptake of  $O_3$  correlated”? Treutter (2005) reported that the antioxidant compounds can be divided into two groups: “preformed” and “induced” compounds, the latter being synthesized by plants in response to physical injury, infection or stress. Concerning our results, it is possible to conclude that no significant relationships were found between most of the parameters of antioxidant metabolism and  $POD_0$  suggesting that an imbalance between repair (i.e., the capacity to activate detoxifying systems) and avoidance strategies (i.e., the ability of leaves to partially close stomata to exclude  $O_3$  from leaf intercellular space) occurred. Although recent studies documented that the  $POD$  approach can be considered the best metric to assess  $O_3$  effects on (i) plant productivity (i.e., biomass and yield losses, leaf mass per area etc.), (ii) photosynthetic performance and (iii) visible foliar injury (Gao et al., 2017; Hoshika et al., 2018), the internal mechanism of  $O_3$  sensitivity is controversial. Some studies found that  $O_3$  sensitivity was associated with high stomatal conductance ( $g_s$ , Wittig et al., 2007; Cotrozzi et al., 2016; Yang et al., 2016), but others argued that it depended on antioxidant levels (Nali et al., 2004; Dai et al., 2017). In addition, a wide range of different biochemical, structural and physiological leaf traits can play a pivotal role in determining  $O_3$  response. The relative contributions of these different traits in controlling the inter-specific variation in  $O_3$  sensitivity among a wide range of species remain elusive (Li et al., 2017). A significant and positive relationship between MDA and  $POD_0$  was found in *Q. pubescens* and *Q. robur*, confirming that the greater stomatal  $O_3$  flux in these deciduous oak species (according to biomass results from Hoshika et al., 2018) resulted in pronounced membrane denaturation.

It is possible to conclude that the  $POD$  approach can be used for assessing accelerated leaf senescence in deciduous oak species. In fact, no similar relationship was found in *Q. ilex* that under AA-WW conditions displayed not only lower amounts of AsA, GSH, Tot Car and Tot Phen than the other species, but also the lowest values of  $POD_0$  suggesting that intrinsic physiological and biochemical mechanisms can contribute significantly to the stress tolerance. To conclude,  $O_3$  and drought had antagonistic effects on most biochemical traits which depended on plant species. In particular, we untangled the species-specific biochemical adjustments that may reduce the impact of  $O_3$  when combined with the effect of drought.

## Acknowledgments

This work was financially supported by the Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze (2013/7956) and the LIFE15ENV/IT/000183 project MOTTLES. We would like to thank Alessandro Materassi, Gianni Fasano and Moreno Lazzara for their support during the field work.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.413>.

## References

- Alonso, R., Elvira, S., Gonzalez-Fernandez, I., Calvete, H., Garcia-Gomez, H., Bermejo, V., 2014. Drought stress does not protect *Quercus ilex* L. from ozone effects: results from a comparative study of two subspecies differing in ozone sensitivity. *Plant Biol.* 16, 375–384.
- Assumpção, C.F., Herms, V.S., Pagno, C., Castagna, A., Mannucci, A., Sgherri, C., et al., 2018. Phenolic enrichment in apple skin following post-harvest fruit UV-B treatment. *Post-harvest Biol. Technol.* 138, 37–45.
- Avery, R.J., 2006. Reactivity-based VOC control for solvent products: more efficient ozone reduction strategies. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4845–4850.
- Bansal, S., Hallsby, G., Löfvenius, M.O., Nilsson, M.-C., 2013. Synergistic, additive and antagonistic impacts of drought and herbivory on *Pinus sylvestris*: leaf, tissue and whole-plant responses and recovery. *Tree Physiol.* 33, 451–463.

- Bohler, S., Cuyppers, A., Vangronsveld, J., 2015. Interactive effects between ozone and drought: sorrow or joy? In: Mahalingam, R. (Ed.), *Combined Stresses in Plants - Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 147–157.
- Brunetti, C., Guidi, L., Sebastiani, F., Tattini, M., 2015. Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ. Exp. Bot.* 119, 54–62.
- Burkey, K.O., Wei, C., Eason, G., Ghosh, P., Fenner, G.P., 2000. Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and tolerant genotypes of snap bean. *Physiol. Plant.* 110, 195–200.
- Bussotti, F., Bettini, D., Grossoni, P., Mansueto, S., Nibbi, R., Soda, C., Tani, C., 2002. Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environ. Exp. Bot.* 47, 11–23.
- Butkovic, V., Cvitas, T., Klasing, L., 1990. Photochemical ozone in the Mediterranean. *Sci. Total Environ.* 99, 145–151.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239–264.
- Close, D.C., Beadle, C.L., 2003. Alternate energy dissipation? Phenolic metabolites and the xanthophyll cycle. *J. Plant Physiol.* 160, 431–434.
- CLRTAP, 2017. Mapping critical levels for vegetation. Chapter III of manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends. UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution [www.icpmapping.org](http://www.icpmapping.org), Accessed date: 28 February 2018.
- Conklin, P.L., Barth, C., 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ.* 27, 959–970.
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Landi, M., Massai, R., Nali, C., Guidi, L., Lorenzini, G., 2016. Variations in physiological and biochemical traits of oak seedlings grown under drought and ozone stress. *Physiol. Plant.* 157, 69–84.
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Guidi, L., Lorenzini, G., Massai, R., Nali, C., Landi, M., 2017a. Cross-talk between physiological and metabolic adjustments adopted by *Quercus cerris* to mitigate the effects of severe drought and realistic future ozone concentrations. *Forests* 8, 148. <https://doi.org/10.3390/f8050148>.
- Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Guidi, L., Landi, M., Lorenzini, G., Massai, R., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Vernieri, P., Nali, C., 2017b. Losing the warning signal: drought compromises the cross-talk of signaling molecules in *Quercus ilex* exposed to ozone. *Front. Plant Sci.* 8, 1020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01020>.
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Massai, R., Landi, M., 2018a. Living in a Mediterranean city in 2050: broadleaf or evergreen “citizens”? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8161–8173.
- Cotrozzi, L., Campanella, A., Pellegrini, E., Lorenzini, G., Nali, C., Paoletti, E., 2018b. Phenylpropanoids are key players in the antioxidant defense to ozone of European ash, *Fraxinus excelsior*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8137–8147.
- Curtu, A.L., Șofletea, N., Toader, A.V., Enescu, C.M., 2011. Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought tolerant *Q. pedunculiflora* K Kock. *Ann. For. Sci.* 68, 1163–1172.
- Czarnocka, W., Karpiński, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011>.
- Dai, L., Li, P., Shang, B., Liu, S., Yang, A., Wang, Y., Feng, Z., 2017. Differential responses of peach (*Prunus persica*) seedlings to elevated ozone are related with leaf mass per area, antioxidant enzymes activity rather than stomatal conductance. *Environ. Pollut.* 227, 380–388.
- Davey, M.W., Dekempener, E., Keulemans, J., 2003. Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Anal. Biochem.* 316, 74–81.
- Dizengremel, P., Jolivet, Y., Tuzet, A., Ranieri, A., Le Thiéc, D., 2013. Integrative leaf-level phytotoxic ozone dose assessment for forest risk modelling, in: Matussek, R., Clarke, N., Cudlin, P., de Carvalho, M.H.C., 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 3, 156–165.
- EEA, 2017. Air quality in Europe – 2017 report. EEA Report No17/20217. European Environment Agency (<https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2017>).
- Feng, Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., Zhu, J., 2010. Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environ. Pollut.* 158, 3539–3545.
- Fini, A., Guidi, L., Ferrini, F., Brunetti, C., Di Fernando, M., Bircoliti, S., Pollastri, S., Calamai, L., Tattini, M., 2012. Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: an excess light stress affair? *J. Plant Physiol.* 169, 929–939.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18.
- Gao, F., Catalayud, V., Paoletti, E., Hoshika, Y., Feng, Z., 2017. Water stress mitigates the negative effects of ozone on photosynthesis and biomass in poplar plants. *Environ. Pollut.* 230, 268–279.
- Gest, N., Gautier, H., Stevens, R., 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64, 33–53.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Guidi, L., Remorini, D., Cotrozzi, L., Giordani, T., Lorenzini, G., Massai, R., Nali, C., Natali, L., Pellegrini, E., Trivellini, A., Vangelisti, A., Vernieri, P., Landi, M., 2017. The harsh life of an urban tree: the effect of a single pulse of ozone in salt-stressed *Quercus ilex* saplings. *Tree Physiol.* 37, 246–260.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dörmann, P., 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3451–3469.
- Hoshika, Y., Moura, B., Paoletti, E., 2018. Ozone risk assessment in three oak species as affected by soil water availability. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8125–8136.
- Jolivet, Y., Bagard, M., Cabané, M., Vaultier, M.N., Gandin, A., Afif, D., Dizengremel, P., Le Thiéc, D., 2016. Deciphering the ozone-induced changes in cellular processes: a prerequisite for ozone risk assessment at the tree and forest levels. *Ann. For. Sci.* 73, 923–943.
- Li, P., Feng, Z., Catalayud, V., Yuan, X., Xu, Y., Paoletti, E., 2017. A meta-analysis on growth, physiological, and biochemical responses of woody species to ground-level ozone highlights the role of plant functional types. *Plant Cell Environ.* 40, 2369–2380.
- Logemann, E., Tavamaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., Hahlbrock, K., 2000. UV light selectively coincides supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1903–1907.
- Miller, J.D., Arteca, R.N., Pell, E.J., 1999. Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 1015–1023.
- Nali, C., Paoletti, E., Marabottini, R., Della Rocca, G., Lorenzini, G., Paolacci, A.R., Ciuffi, M., Badiani, M., 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmos. Environ.* 38, 2247–2257.
- Ninemetz, Ü., Kollist, H., García-Plazaola, J.I., Hernández, A., Becerril, J.M., 2003. Do the capacity and kinetics for modification of xanthophyll cycle pool size depend on growth irradiance in temperate trees? *Plant Cell Environ.* 26, 1787–1802.
- Noctor, G., Reichheld, J.P., Foyer, C.H., 2018. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80, 3–12.
- Paoletti, E., Materassi, A., Fasano, G., Hoshika, Y., Carriero, G., Silaghi, D., Badea, O., 2017. A new-generation 3D ozone Face (Free Air Controlled Exposure). *Sci. Total Environ.* 575, 1407–1414.
- Pellegrini, E., Campanella, A., Cotrozzi, L., Tonelli, M., Nali, C., Lorenzini, G., 2018. What about the detoxification mechanisms underlying ozone sensitivity in *Liriodendron tulipifera*? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8148–8160.
- Pollastri, M., Desotgiu, R., Camin, F., Ziller, L., Marzuoli, R., Gerosa, G., Bussotti, F., 2013. Intra-annual pattern of photosynthesis, growth and stable isotope partitioning in a poplar clone subjected to ozone and water stress. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1761–1772.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.
- Reich, P.B., 1987. Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiol.* 3, 63–91.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanisms in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.
- Treutter, D., 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7, 581–591.
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20.
- Vranckx, G., Jacquemyn, H., Mergeay, J., Cox, K., Janssens, P., Gielem, B.A.S., Muys, B., Honnay, O., 2014. The effect of drought stress on heterozygosity-fitness correlations in pedunculated oak (*Quercus robur*). *Ann. Bot.* 113, 1057–1069.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant Cell Environ.* 30, 1150–1162.
- Yang, N., Wang, X., Cotrozzi, L., Chen, Y., Zheng, F., 2016. Ozone effects on photosynthesis of ornamental species suitable for urban green spaces of China. *Urban For. Urban Green.* 20, 437–447.
- Yuan, X., Calatayud, V., Gao, F., Fares, S., Paoletti, E., Tian, Y., Feng, Z., 2016. Interaction of drought and ozone exposure on isoprene emission from extensively cultivated poplar. *Plant Cell Environ.* 39, 2276–2287.



## Réponses du peuplier soumis à une combinaison de contraintes, ozone et sécheresse : dynamique de la conductance stomatique et des capacités antioxydantes foliaires

---

**Mots clés** : stress oxydant, acide ascorbique, glutathion, échanges gazeux, phytohormones

Les modèles climatiques indiquent qu'il est très probable que les végétaux soient de plus en plus exposés à deux facteurs de stress environnementaux : l'ozone troposphérique ( $O_3$ ) et le déficit hydrique du sol, tous deux pouvant provoquer un stress oxydant pour le végétal. Dans des conditions naturelles, ces deux facteurs peuvent être concomitants ou se succéder. L'impact de l' $O_3$  et de la sécheresse nécessite donc une attention particulière. Afin de déterminer les réponses de défense mises en place par les arbres, deux génotypes de *Populus nigra x deltoides* (Carpaccio et Robusta) ont été exposés aux contraintes séparées ou à leur combinaison en conditions contrôlées dans des chambres de culture. Pour explorer les effets des stress et l'interaction entre les deux contraintes, nous avons ciblé les deux premiers niveaux de défense des plantes que sont le contrôle de l'ouverture/fermeture des stomates et les processus de détoxification cellulaire. Nos résultats montrent que Carpaccio et Robusta sont tous deux relativement tolérants à une sécheresse modérée grâce à un contrôle efficace des stomates. Face à l' $O_3$ , cependant, les deux génotypes adoptent des stratégies de réponse différentes : un évitement important pour Carpaccio et une maximisation de l'assimilation au détriment des feuilles pour Robusta. Cela se traduit par une différence de fermeture des stomates. Les deux génotypes ne font alors pas face au même flux d' $O_3$  entrant dans les feuilles, ce qui impacte la détoxification cellulaire, dans laquelle le glutathion semble jouer un rôle majeur. En lien avec les modifications de capacité antioxydante, l'activité des enzymes du cycle ascorbate-glutathion (MDHAR, DHAR et GR) et/ou l'expression des gènes codant pour ces protéines sont modifiées. En combinaison de stress, le déficit hydrique protège le végétal du stress oxydant induit par l' $O_3$  en amplifiant la fermeture des stomates. En revanche, la croissance de l'arbre est impactée par l'effet additif des deux contraintes. De plus, l'induction de voies de régulation hormonales différentes par les deux contraintes pourrait modifier le « cross-talk » complexe régulant la réponse au stress combiné. Enfin, dans le cas d'une succession de stress, l'exposition à l' $O_3$  avant un épisode de sécheresse impacte faiblement la réponse de l'arbre. Cependant, un ralentissement de la fermeture des stomates induit par l' $O_3$  est observé malgré l'arrêt de la fumigation. Il est donc nécessaire de prendre en compte le ralentissement et la fermeture des stomates induit par l' $O_3$  et le déficit hydrique dans les modèles de conductance stomatique utilisés pour calculer l'indicateur du flux d' $O_3$  entrant, le  $POD_y$  (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of  $y$  nmol  $O_3$   $m^{-2}.s^{-1}$ ).

## Responses of poplar submitted to combined stresses, ozone and drought: dynamics of stomatal conductance and foliar antioxidant capacities

---

**Keywords** : oxidative stress, ascorbate, glutathione, gas exchanges, phytohormones

Climate models indicate that it is very likely that plants will be more and more exposed to two environmental stressors: ground-level ozone ( $O_3$ ) and soil water deficit, both causing oxidative stress to the plant. Under natural conditions, these two factors can be concomitant or successive. Therefore, the impact of  $O_3$  and drought requires special attention. In order to determine the defensive responses adopted by trees, two genotypes of *Populus nigra x deltoides* (Carpaccio and Robusta) were exposed to separate or combined stresses under controlled conditions in growing chambers. To explore the effects of stresses and their interaction, we targeted the plant's first two levels of defence: i) the control of stomatal opening and closing, ii) the cellular detoxification processes. Our results show that both Carpaccio and Robusta are relatively tolerant to moderate drought thanks to an efficient stomatal control. However, different response strategies were adopted by the two genotypes to cope with  $O_3$ . For Carpaccio, the strategy is avoidance, and for Robusta, the strategy is maximization of net  $CO_2$  assimilation at the expense of leaves. This results in a difference in the stomatal closure. The two genotypes do not face the same flow of  $O_3$  entering the leaves. This impacts cellular detoxification in which glutathione seems to play a major role. Also, the activity of ascorbate-glutathione cycle enzymes (MDHAR, DHAR and GR) and/or the expression of genes encoding these proteins are modified. Under combined stresses, the water deficit protects the plant from the  $O_3$ -induced oxidative stress by amplifying the stomatal closure. Nevertheless, the tree growth is impacted by the additive effect of the two stresses. Furthermore, the induction of different hormonal regulatory pathways by the two stressors could modify the complex "cross-talk" regulating the response to combined stress. Finally, in the case of a succession of stresses, exposure to  $O_3$  prior to a drought episode has a weak impact on the tree's response. However,  $O_3$  induced a stomatal sluggishness in closure despite the cessation of fumigation. It is therefore necessary to take into account stomatal closure and sluggishness induced by  $O_3$  and water deficit in the stomatal conductance models used to calculate the indicator of  $O_3$  flux inside the leaves,  $POD_y$  (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of  $y$  nmol  $O_3$   $m^{-2}.s^{-1}$ ).