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).



STRESS SYNDROME RESPONSES OF PLANTS

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, 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 (O₃) et la sécheresse édaphique, autrement nommée déficit hydrique du sol.

3

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^e, 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^e, 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 CO₂ 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; Sussmilch 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'O₃ remontent à l'histoire grecque, dans *l'Iliade et l'Odyssée* (VIII^e 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'O₃ en laboratoire en faisant passer un arc électrique dans du dioxygène (O₂). 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 (NO₂) en monoxyde d'azote et un atome d'oxygène (O²). Cet atome réagit avec le dioxygène (O₂) pour former l'O₃.

Il nommera cette substance « ozein », qui signifie « exhaler une odeur » en grec. Les recherches de la fin du XIX^e se concentrent ensuite sur les propriétés chimiques de l'O₃. À partir des années 1920, le spectromètre de G. Dobson, physicien à l'université d'Oxford, permet la mesure de l'O₃ dans l'atmosphère et la découverte des fluctuations journalières et saisonnières de ses concentrations. Le XX^e siècle permettra de découvrir la répartition de l'O₃ dans l'atmosphère et le rôle protecteur de la couche d'O3 stratosphérique. En effet, le gaz est majoritairement présent dans la stratosphère où il forme une barrière aux ultraviolets : la couche d'O3 (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'O₃ est équilibrée par des pertes dues à des réactions catalytiques avec les oxydes d'azote (NO_x) et le radical hydroxyle (HO), mais les activités humaines peuvent influencer la balance (production/perte). La formation d'O3 dans la troposphère (Figure 2) peut être brièvement résumée comme étant l'oxydation par HO du monoxyde de carbone (CO), du méthane (CH₄) ou de composés organiques volatils (COV) en présence de NO_x (Monks et al., 2015). En somme, l'O₃ 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 apparaitre 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'O₃ grâce à la recréation en laboratoire de SMOG artificiel par combustion de pétrole en présence $d'O_3$

I.1.3.2. Passé, présent et futur niveaux d'O₃ dans la troposphère

Les premières mesures de l'O₃ troposphérique commencent au milieu du XIXe 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'O₃ 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^e à la fin du XX^e, les concentrations globales d'O₃ sont donc estimées à partir des valeurs de quelques stations de mesure seulement. Or, la concentration d'O₃ 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'O₃ à partir de l'évolution des gaz précurseurs. Malgré ces limites, il a pu être estimé que les concentrations moyennes d'O₃ ont doublé au XX^e 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'O3 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'O3 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'O3 et à l'absence de recyclage par les NOX 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_x représente ici la somme $O_3 + NO_2$. (Delmas et al., 2005)

Les modèles prédictifs de l'évolution des concentrations d'O₃ sont fortement dépendants des politiques concernant les émissions anthropiques des précurseurs de l'O₃ (NO_x, CH₄...). En effet, l'évolution des concentrations futures d'O₃ 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^e rapport du GIEC, les concentrations d'O₃ seraient stables voire diminueraient de l'ordre de -4% à -16%. Le modèle RCP8.5 (forçage radiatif le plus élevé +8.5 W.m⁻²) est une exception puisqu'il prédit une augmentation de 18% des concentrations moyennes d'O₃ 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'O₃ : deux possibilités

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

En partant du simple fait que l'O₃ 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'O₃, 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'O₃ ont été mesurés, contre 40 à 60 ppb en période normale (Lee et al., 2006).

I.1.4.2. Combinaison successive : pics printaniers d'O₃ et sécheresses estivales

La multiplication des mesures d'O₃ troposphérique durant le XX^e 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'O₃ entre la troposphère et la stratosphère
- Une prolongation du temps de vie photochimique de l'O₃ en hiver responsable d'une accumulation du gaz durant l'hiver
- Une accumulation des précurseurs de l'O₃ durant l'hiver et une production photochimique plus importante au printemps

Le pic d'O₃ 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'O₃ (Pollastrini et al., 2014). Les résultats obtenus par Pollastrini et son équipe suggèrent que les plantes soumises à des fortes concentrations d'O₃ au printemps pourraient donc être particulièrement sensibles aux sécheresses estivales.

I.2. Impact de l'O₃ 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'O₃, les feuilles peuvent présenter des chloroses et des nécroses (Vollenweider et al., 2003). Le symptôme le plus commun est l'apparition de points (« stipples ») 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'O₃ 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 desséchement 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'O₃ (Bréda et al., 2006; Sicard et al., 2016b).

Les deux contraintes vont également modifier la croissance des arbres. La littérature O₃ 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'O₃: (a) le type de plante, (b) la concentration moyenne d'O₃ et le type d'expérimentation (phytotron, serre ou champs) et (c) la durée de l'exposition au gaz. Sous O₃, 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'O₃ sur des paramètres de croissance pour plusieurs espèces ligneuses. Les symboles représentent le pourcentage moyen de changement entre des concentrations d'O₃ 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'O₃ est entre crochets (axe des ordonnées). Li et al, (2017)

L'O₃ 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'O₃ 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'O₃ 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). L'impact de l'O₃ 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 (H2O, CO2, 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 CO₂, 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; Pessarakli, 2018; Sussmilch 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 CO₂ entrant et de la vapeur d'H₂O 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'O₃ 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'O₃, il permet de limiter les entrées du gaz. Cependant, l'obtention d'un équilibre entre les entrées de CO₂ nécessaires pour alimenter la photosynthèse et la maintenance des processus vitaux est nécessaire au maintien du fonctionnement physiologique de la plante sous contraintes.



| | ROS | t _{1/2} | Migration distance | Mode of action | Production site | Scavenging systems |
|--|---|------------------|-----------------------|--|---|---|
| | Superoxide (O*-2) | 1–4 µs | 30 nm | Reacts with Fe–S proteins Dismutates to H ₂ O ₂ | Apoplast (RBOHs), chloroplasts, mitochondria, peroxisomes, electron transfer chains | SOD, flavonoids, ascorbate |
| | Hydroxyl radical (OH•) | 1 ns | 1 nm | Extremely reactive with all biomolecules including DNA, RNA, lipids, and proteins | Iron and H ₂ O ₂ (Fenton reaction) | Flavonoids, proline, sugars, ascorbate, |
| | Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) | >1 ms | >1 µm | 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 O₂) | 1–4 μs | 30 nm | Oxidizes lipids, proteins (Trp, His, Tyr, Met, and Cys residues), and G residues of DNA | Membranes, chloroplasts, nuclei | Carotenoids and α-tocopherol |

Figure 5 : Formation et propriétés des principaux ROS. (A) Formation des différents ROS à partir du dioxygène (O_2) . L'excitation ou la réduction de l' O_2 peut directement générer l'oxygène singulet (1O_2) ou le radical superoxyde (O_2^{-}). Le superoxyde peut se dismuter pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). H_2O_2 peut interagir avec le fer (Fe²⁺) 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; Pessarakli, 2018).

Dans le cas d'une exposition à l'O₃, 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'O₃ entrante et modifient l'efficience d'utilisation de l'eau (Hoshika et al., 2015). En plus d'induire la fermeture des stomates et donc les entrées de CO₂, 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, différentiation 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'O₃, 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'O₃ vont conduire à la formation des ROS (Figure 7). De la rapidité de la réaction résulte l'absence d'O₃ 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 peroxysome 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 CO_2 (Ci) 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 CO_2 . Il en résulte une augmentation de la production de H_2O_2 dans le peroxysome (1) et une augmentation possible de la production d'anions superoxydes (O_2^-) et H_2O_2 (2) ou d'oxygène singulet (1O_2) (3) par la chaine de transport d'électrons dans le chloroplaste.

En réponse au stress oxydant généré par l'O₃ ou la sécheresse, l'ensemble des mécanismes de détoxication 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 tocophéroles, 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 la cas d'une exposition à l'O₃, la littérature décrit des augmentations de ROS (H₂O₂ et O_2^-) 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 lipophiliques, 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'O₃ 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 $[O_3]$ (eO₃) sur des mécanismes antioxydants des arbres (Li et al., 2017). Les symboles représentent le pourcentage moyen de changement entre des concentrations élevées d'O₃ 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'O₃ 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.

Non-enzymatic antioxidants



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 Haliwell-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'O3 (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'O₃ 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 O3 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 détoxication. Par ailleurs, de nombreuses études soulignent l'importance des enzymes du cycles ascorbate-glutathion en réponse à l'O₃ (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 efficiente de l'AsA et du GSH peut être déterminante pour faire face au stress induit par l'O₃.

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 (H₂O₂) 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 (H₂O₂) 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 transférases, 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 (Ca²⁺, Mg⁺, Fe²⁺...). Ainsi, une accumulation de Ca²⁺, second messager, dans le cytosol a été observé sous O₃ (Baier et al., 2005). La dégradation liées aux phospholipases, MAP kinases et à la régulation des phytohormones : jasmonates, éthylène, acide abcissique 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 entreelles, 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'abscision 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-acetique (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'O₃.



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) 50ribonucleotide 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-Oglucosyltransferase, either transzeatin- 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) b-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, No-isopentenyladenosine-50-diphosphate; iPRTP, No-isopentenyladenosine-50-triphosphate; iPRMP. *N*₆-isopentenyladenosine-5₀-monophosphate; iPR,*N*₆-isopentenyladenosine; iP7G. N_{6-} isopentenyladenosine-7-glucoside; iP9G, No-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.

I.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 cytokinine, 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-methyl-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'-ribonucleotidephosphohydrolase). Les CKs glycosylées sont, quant à elles, des formes inactives. Par exemple, sous l'action de la zeatine-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 O₃ 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'O₃ 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).

I.2.6.3. Acide abscissique

L'ABA est impliqué dans le contrôle de la dormance et l'abscision 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 lipophilique), grâce à la scission par oxydation de 9-cis epoxy-carotenoides (zéaxanthine) en xanthoxine par l'enzyme 9-cis-epoxycarotenoide dioxygenases (NCED) dans les plastes. Les xanthoxines sont ensuite converties en aldéhyde abscisique par l'enzyme xanthoxine oxidase, puis l'aldehyde abscisique en ABA (Figure 12).

Or, le lien entre cette phytohormone et la fermeture des stomates sous stress oxydant due à l'O₃ 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'H₂O₂ a été reliée à la fermeture des stomates induite par l'ABA (Zhang et al., 2001).

27

I.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'O₃ 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 apparait légitime de se poser la question de l'implication de l'acide jasmonique (JA) dans la signalisation mise en place en réponse à l'O₃. Chez les arbres, JA a été mis en évidence comme une importante molécule signale 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'O₃ (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'O₃, 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'O₃ (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

28

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 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'O₃ reste à éclaircir.

I.2.6.5. Acide salicylique

L'acide salicylique (SA), acide 2-hydroxy benzoique, 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 & Pajerowska-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 Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL), qui convertit la phénylalanine en acide trans-cinnamique. La seconde voie est caractérisée par une enzyme clée, 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).

I.2.6.6. Éthylène

L'éthylène est un gaz (C_2H_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).

I.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'O₃ 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 O₃ 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'O₃ (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'H₂O₂ 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'O₃ (Wilkinson & Davies, 2010, 2009). En plus, la biosynthèse d'ET peut-être favorisé 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 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 O₃ 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'O₃ sous sécheresse (Cotrozzi et al., 2017a) ou de la modification, chez *Leontodon hispidus*, de la fermeture des stomates induite par la sécheresse sous O₃ 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'O₃ et la sécheresse.

I.3. Analyse du risque causé par l'O3 sur la végétation

L'ensemble des mécanismes mis en œuvre de la détection du stress à la mise en place des défenses (détoxication 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'O₃ 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'O3 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⁻¹) 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 éclairement énergétique minimum de 50 W.m⁻² (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'O3 dans les feuilles. Pour compenser ce manque, la communauté scientifique s'est orientée vers un indice prenant en compte le flux d'O3 entrant dans les feuilles : le PODy (Phytotoxic Ozone Dose above a treshold of y nmol $O_3 \text{ m}^{-2}$. s⁻¹). Cet indice a pris plusieurs noms dans la littérature, dont AFstY (Accumulated stomatal flux above a threshold of Y nmol O₃. m⁻². s⁻¹) et CUO (cumulative ozone uptake), qui correspond au POD₀. 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 O₃ m⁻². s⁻¹. L'objectif du POD_Y est de couvrir des effets climatiques multifactoriels et les caractéristiques de la végétation (Anav et al., 2015). Actuellement, pour utiliser le PODy, 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'O₃ 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 R², soit le modèle qui s'ajustera le mieux aux données. Le modèle de Tuzet et al. (2011) intègrant l'entrée de l'O₃ 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'O₃. Cette détermination efficace du risque dû à l'O₃ 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 CO₂...) 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'O3 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'O3 combiné à la sécheresse induit une modification de l'allocation de carbone chez le pin d'alep, Pinus halepensis (Gerant et al., 1996). L'O₃ 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'épicea et le hêtre en chambre à ciel ouvert dans les Vosges révèle une plus grande sensibilité de l'épicea comparé au hêtre en condition de combinaison de stress (O₃ et sécheresse), principalement due à une perturbation de l'ouverture des stomates par l'O₃ (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'O₃ de l'expression de l'alternative oxydase (AOX) mitochondriale (Dizengremel, 2001) et la synthèse de lignines condensées (Cabane et al., 2004). L'O₃ 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'O₃ 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'O₃. Cette réponse pourrait être lié à une plus forte corrélation entre l'augmentation de l'activité de la PEPC et l'activité de deux NADPdéshydrogénases (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'O₃ 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 détoxication et de la conductance stomatique sont les deux processus identifiés qui agissent en tant que barrière à l'O₃ et à ses dérivés. Sous sécheresse, la fermeture des stomates permet de limiter les pertes en eau tandis que les processus de détoxication 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'O₃ 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'O₃ pourrait au contraire aggraver les perte en eau (Bohler, 2010; Pollastrini et al., 2014). De plus, la sécheresse entraîne, comme l'O₃, 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'O₃ pourraient également intervenir par la suite lors de la sécheresse et rejoindre l'hypothèse de la tolérance croisée. L'exposition à l'O₃ 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'O₃ des deux génotypes 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 détoxication 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 O₃ peut-il modifier la réponse de la plante à la sécheresse ? Dans quelle mesure les mécanismes de défense mis en place pour contrer l'O₃ peuvent-ils avoir un effet bénéfique sous sécheresse ou, au contraire, comment la plante peut-elle gérer les dégâts dus à l'O₃ 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.