

**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'O₃ 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'O₃ dans les feuilles. Cependant, en favorisant la fermeture des stomates, le déficit hydrique du sol limite également les apports de CO₂ 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'O₃ 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 géotypes 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'O₃
- la combinaison des deux traitements précédents

Les objectifs sont i) d'identifier si la sécheresse modifie la réponse du peuplier due à l'O₃ et vice et versa, et ii) de savoir s'il existe une différence de réponse entre les 2 géotypes. 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'O₃ et/ou à la sécheresse sur un dispositif O₃-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'O₃
- la combinaison des deux traitements précédents

Les objectifs sont i) d'explorer la réponse hormonale sous O₃ 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 (O₃) and drought increase tree oxidative stress. To protect forest health, we need to improve risk assessment, using metric model such as the phytotoxic O₃ dose above a threshold of $y \text{ nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (POD_y), while taking into account detoxification mechanisms and interacting stresses. The impact of drought events on the effect of O₃ pollution deserves special attention. Water deficit may decrease O₃ 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 O₃) 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 O₃, 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 POD₀. We noticed a few differences between the two genotypes, particularly concerning the activity of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase relatively to POD₀. 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, O₃ 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 O₃, this strategy prevents the gas from entering the leaf. Nevertheless, in both cases it is necessary for the plant to keep letting CO₂ 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, γ -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 O₃ (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, O₃ 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⁻³, 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⁻².s⁻¹ 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 O₃ treatment (120 nmol.mol⁻¹ for 13 hours). At the end of a 7-day long acclimation period, the 17-day-long O₃ treatment started, while control saplings were exposed to charcoal-filtered air. O₃ was produced from pure O₂ 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 O₃ 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 POD₀ calculations

Net CO₂ assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour (g_w) 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 10th leaf from the apex) at the beginning of the treatment. The air flow in the leaf chamber was set to 450 μmol.s⁻¹. Measurements were made for 30 seconds after stabilisation. g_w measurements allowed to estimate the Phytotoxic Ozone Dose above a threshold flux of 0 nmol.m⁻².s⁻¹ (POD₀), 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 9th and 10th 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 N₂. 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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⁻¹ 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⁻¹ 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 μL 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. 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 μg) 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 MyiQTM 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 IQTM5 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, O₃ 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, O₃ 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), O₃ *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 O₃ treatment reached 20% for both genotypes, mainly as a result of leaf loss (Tableau 6). Nevertheless, leaves started to fall from Robusta on the 7th day and from Carpaccio on the 13th 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:O₃, 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 O₃ on Carpaccio foliage (twice as few fallen leaves under D:O₃ as compared to WW:O₃), but not in Robusta (same leaf loss as WW:O₃, interaction water deficit x ozone x genotype, p<0.001). The impact of the D:O₃ 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; O₃, 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 ₃	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 ₃	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 ₃	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 ₃	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	ns	
Genotype			***	ns	***	***	***	***	**	***		
Water Deficit : Ozone			ns	*	ns	***	*	ns	ns	ns	ns	
Water Deficit : Genotype			***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	
Ozone : Genotype			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Water Deficit : Ozone : Genotype			ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	

Finally, after 18 days, Robusta and Carpaccio appeared similarly impacted by O₃, 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 O₃, and amplified the effects observed under the constraints applied separately in both genotypes.

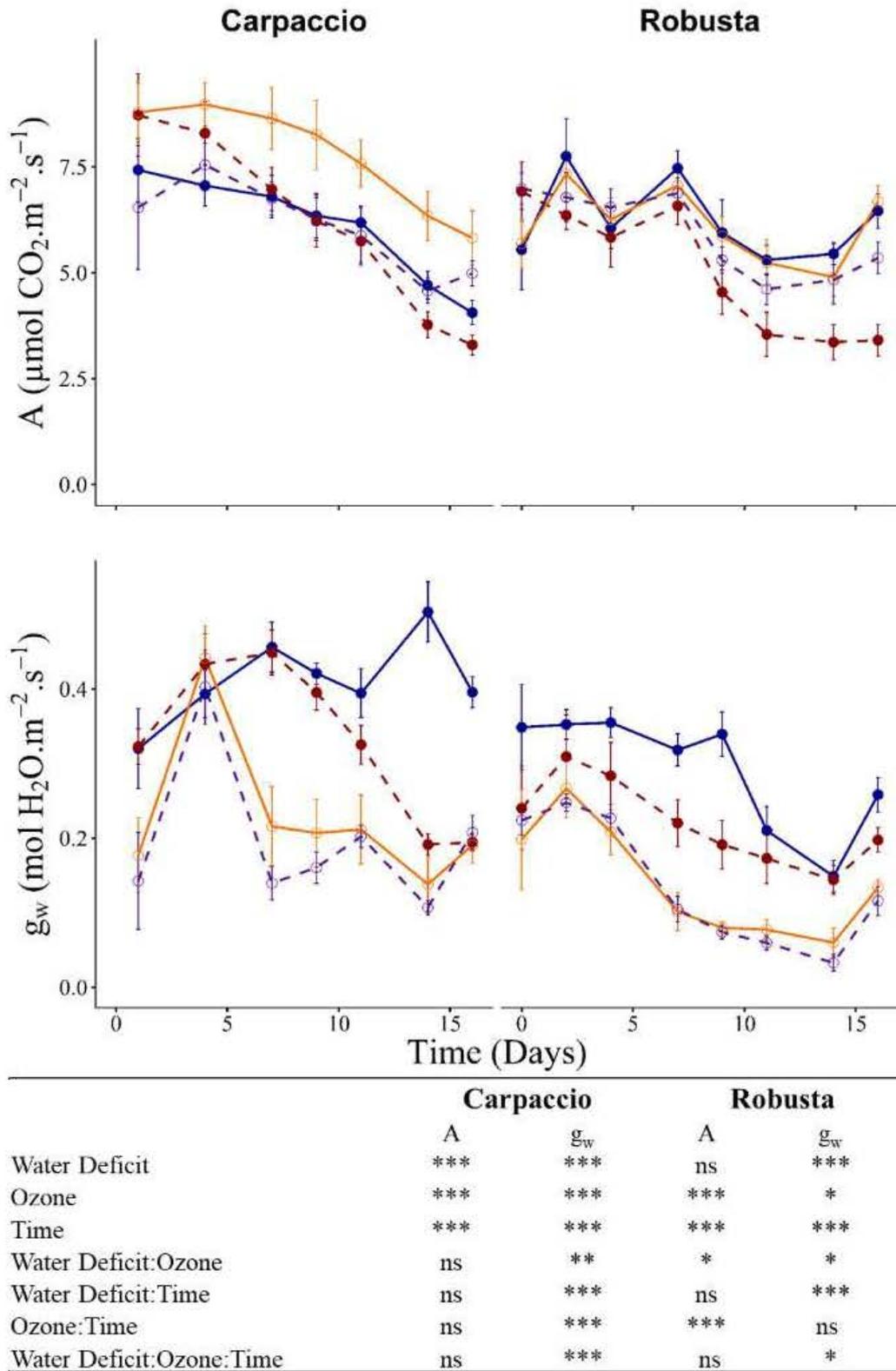


Figure 32 : Impact of ozone or/and water deficit on net CO₂ assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour (g_w). Measurements were conducted on leaves of the Carpaccio and Robusta genotypes at different treatment times. Means \pm se, $n \geq 4$. AF: solid line (WW-AF: blue, and D-AF: orange), and O₃: dashed line (WW-O₃: red and D-O₃: 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; O₃, ozone.

IV.2.3.2. *Gas exchanges*

Gas exchanges (A , net 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 $9 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ at the beginning of the experiment to $5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ after 16 days. Nevertheless, the decrease was more pronounced in the saplings exposed to WW: O_3 . This O_3 effect was clearly visible in Robusta from the 9th to the 16th day of treatment. Water deficit did not modify CO_2 assimilation by Robusta. Carpaccio saplings under water deficit had a higher net 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 CO_2 assimilation was not significantly modified by the combined treatment (D: 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 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 O_3 exposure). In Robusta, it decreased from the beginning of O_3 fumigation. g_w was also drastically impacted by water deficit in both genotypes, and the effect started earlier than in the 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: 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 POD_0 levels between the two genotypes and between treatments (Figure 33). In the well-watered condition, POD_0 was higher in Carpaccio leaves than in Robusta leaves. In response to water deficit and as a consequence of stomatal closure, 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 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.

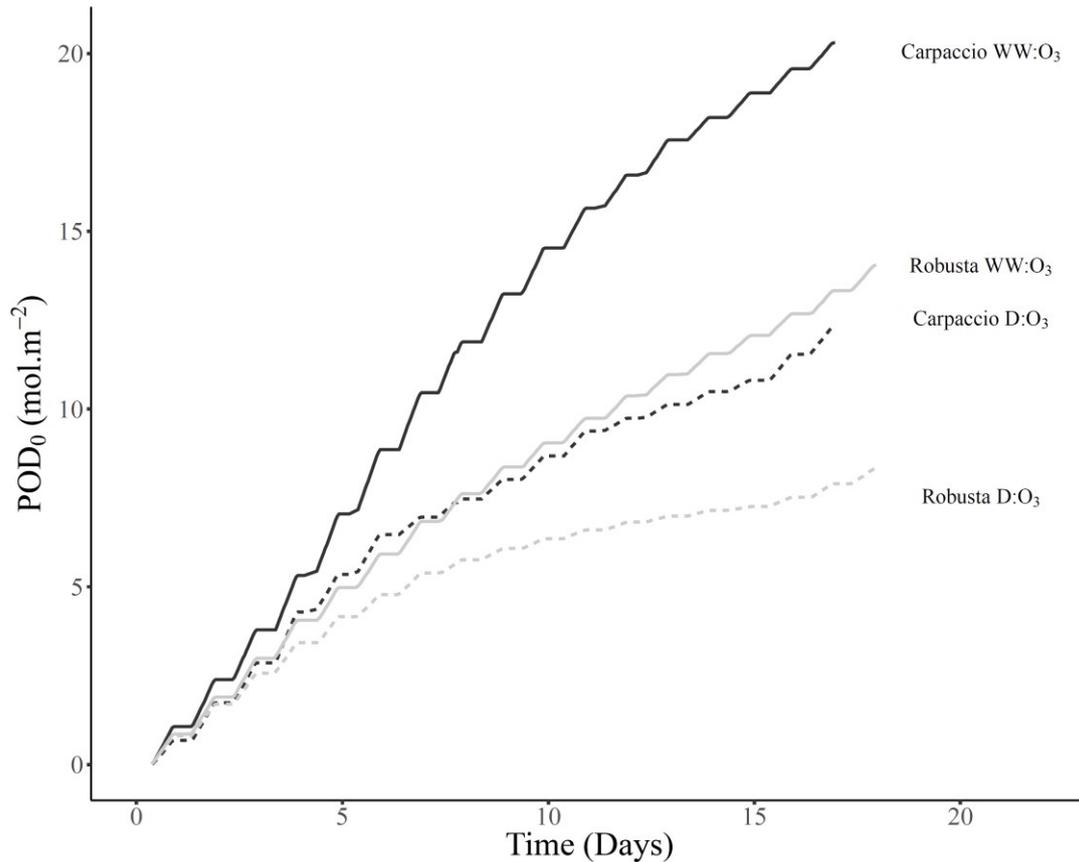


Figure 33 : Evolution of the Phytotoxic Ozone Dose (POD₀) in the Carpaccio and Robusta genotypes under different water status over the 17 days of O₃ exposure. Carpaccio, black lines; Robusta, grey lines; WW, solid line; D, dashed line. WW, well-watered; D, water deficit; O₃, ozone.

In summary, O₃ treatment impacted A and g_w in both genotypes. Under water deficit conditions, g_w decreased more drastically, without any significant effect on CO₂ assimilation by either genotype. In these conditions, we can conclude that other parameters than a lower g_w explain the decreased CO₂ assimilation under O₃ treatments. In combined conditions, alleviated-O₃ conditions (lower POD₀ values as compared to the O₃ treatment) may explain a lower effect on CO₂ assimilation as compared to the O₃ 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⁻¹ 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:O₃ 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 O₃ conditions (WW:O₃), 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:O₃, significant interaction, $p < 0,01$), the stimulatory effect of O₃ 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 O₃ (WW:O₃ and D:O₃) could be related to POD₀ (Figure 35). The total AsA content was not significantly correlated with POD₀ (Figure 35A), while a positive correlation was found between the glutathione content and POD₀ in Carpaccio (Figure 35B). In Robusta, the relationship was weakened by the lower glutathione content in WW:O₃ and D:O₃ conditions at higher POD₀ values.

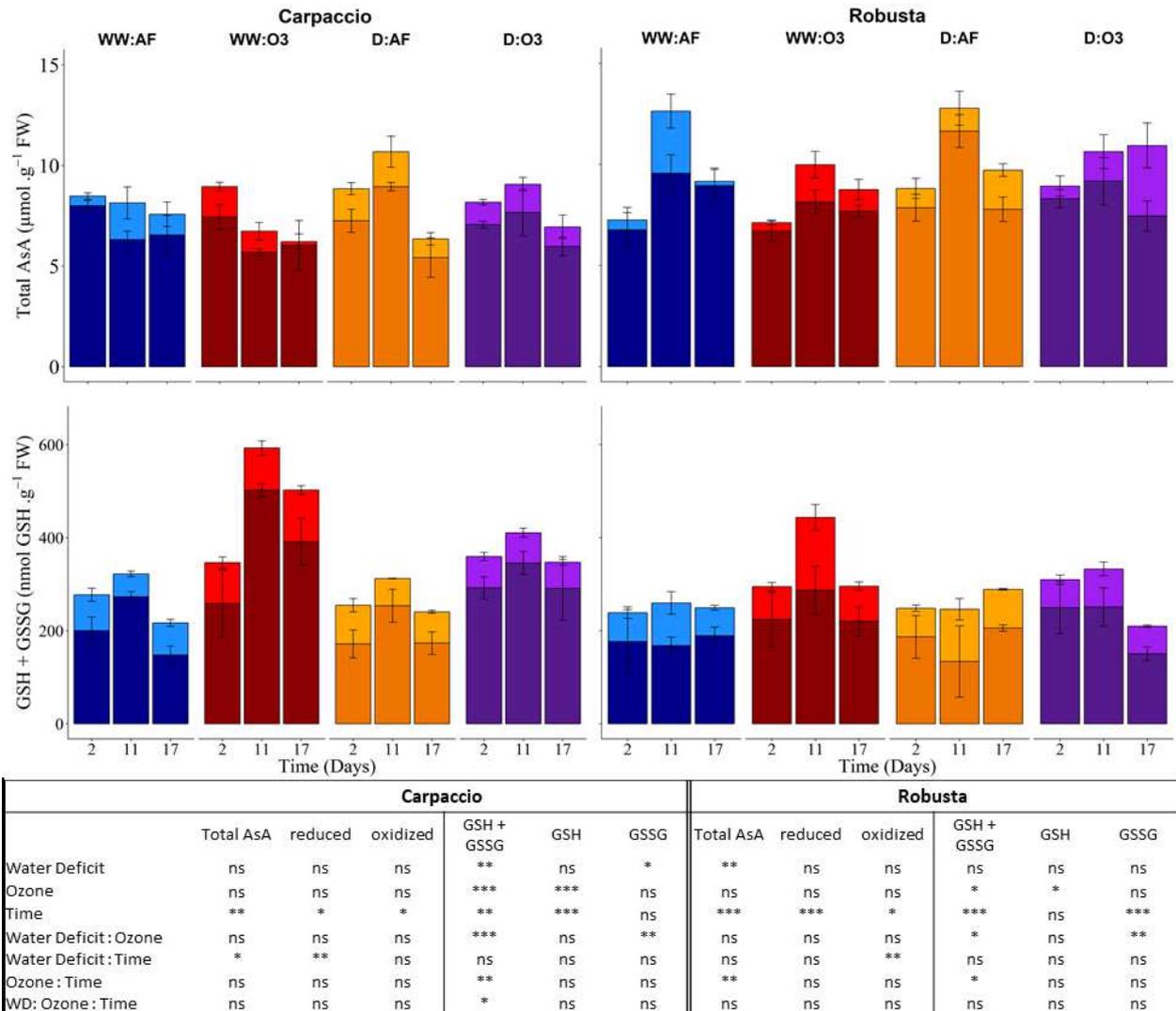


Figure 34 : Impact of ozone or/and water deficit on ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) contents. Total, reduced, and oxidised contents were measured in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes at different treatment times (2, 11, and 17 days). The upper part of the histogram (light colour) represents 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; O₃, ozone. Asterisks show the significance of factors/interaction: '***' $P \leq 0.001$, '**' $P \leq 0.01$, '*' $P \leq 0.05$.

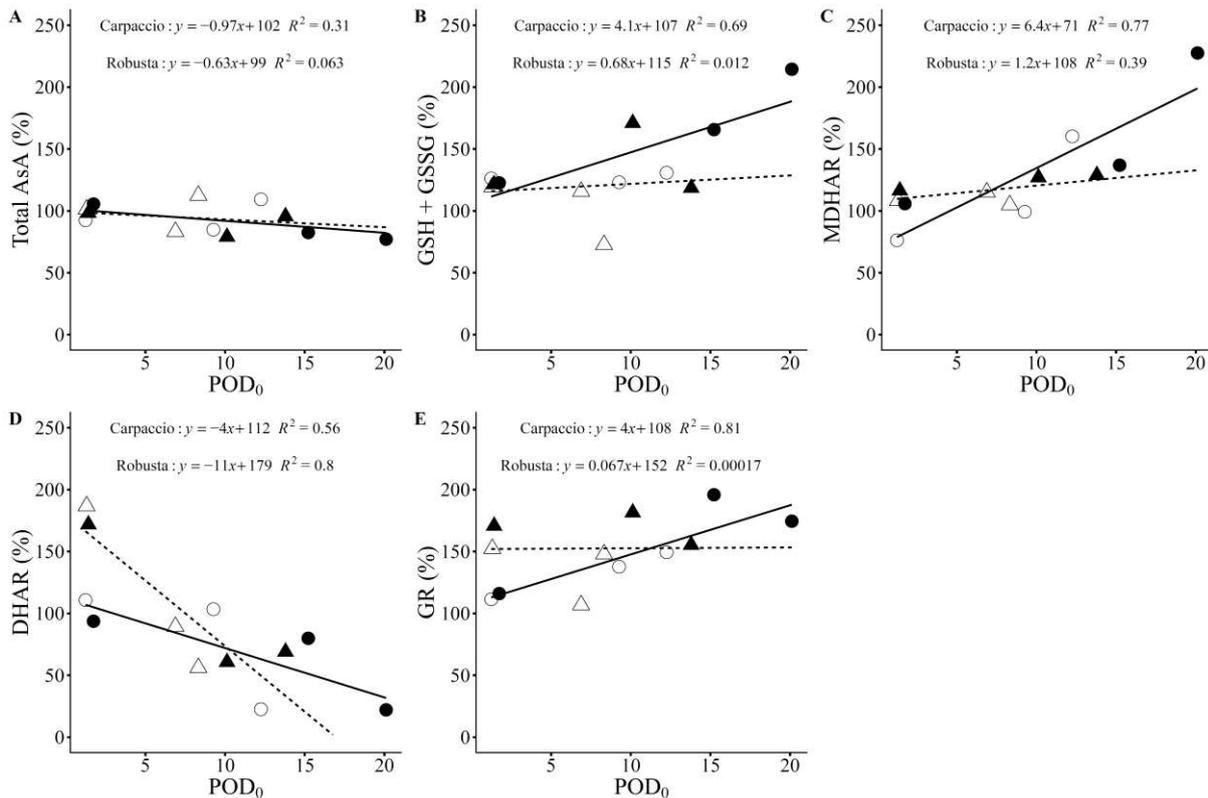


Figure 35 : Expression of ascorbate (A) and glutathione (B) contents, MDHAR (C), DHAR (D), and GR (E) activities relatively to the Phytotoxic Ozone Dose (POD₀). All parameters are presented in percentages relative to the control treatment. Carpaccio, circles and full lines; Robusta, triangles and dotted 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:O₃), 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 O₃ (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. O₃ stress played an important role in these results. Regarding the POD₀ relationship, the response of the two genotypes differed slightly. The MDHAR activity increase was correlated with the POD₀ increase, with a stronger relation for Carpaccio ($R^2 = 0.77$). The DHAR activity decrease was correlated to the POD₀ 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 POD₀ value corresponding to d2. In Carpaccio, the GR activity increase was quite well correlated with POD₀, whereas it appeared constant in Robusta, with values around 50% higher than in WW:AF saplings.

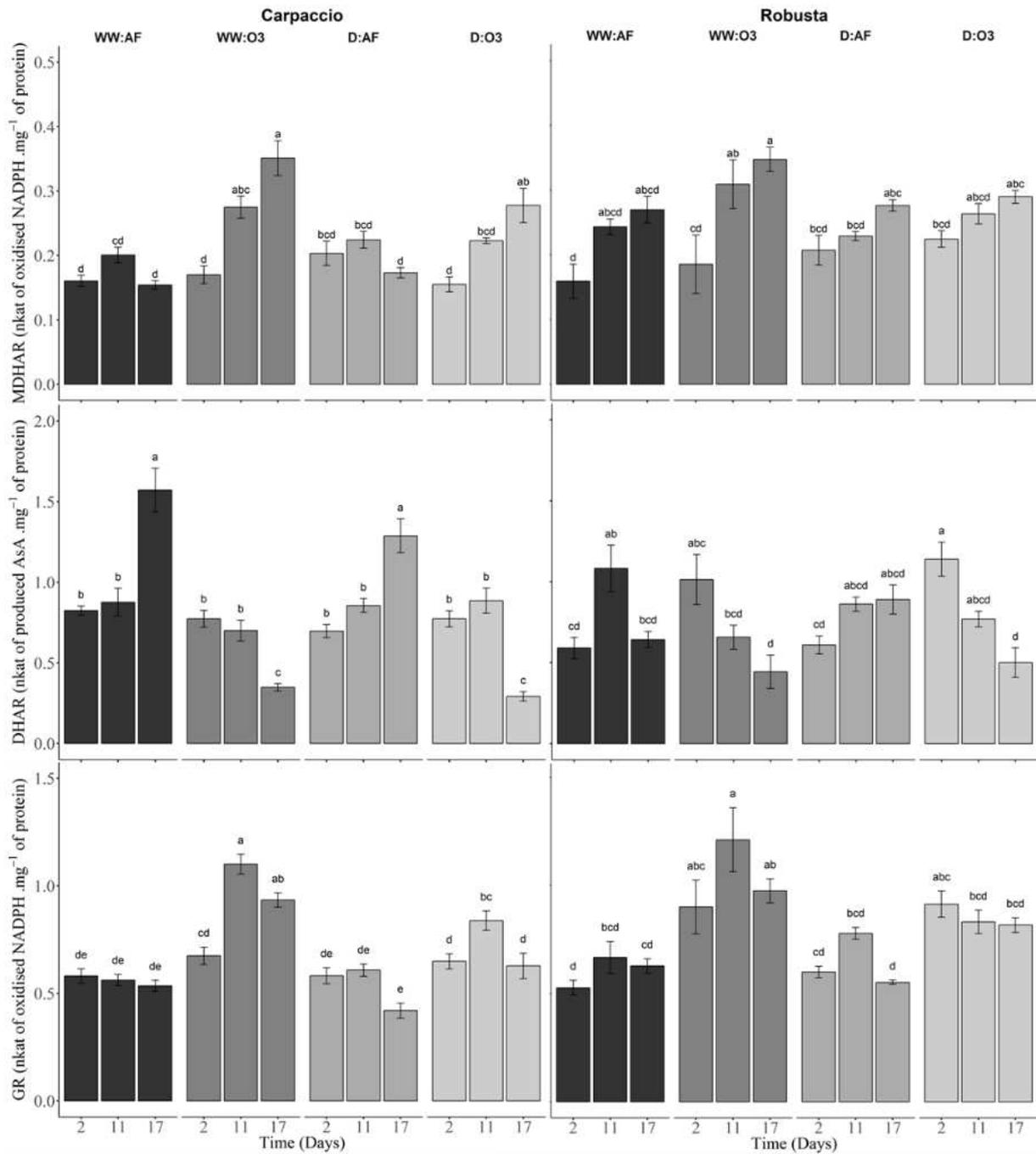


Figure 36 : Impact of ozone or/and water deficit on MDHAR, DHAR, and GR activities. Activities were measured in Carpaccio and Robusta poplar leaves at different treatment times (2, 11, and 17 days). Means \pm se, n=4. Treatments from black to light grey: well-watered and air-filtered (WW:AF), well-watered 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.

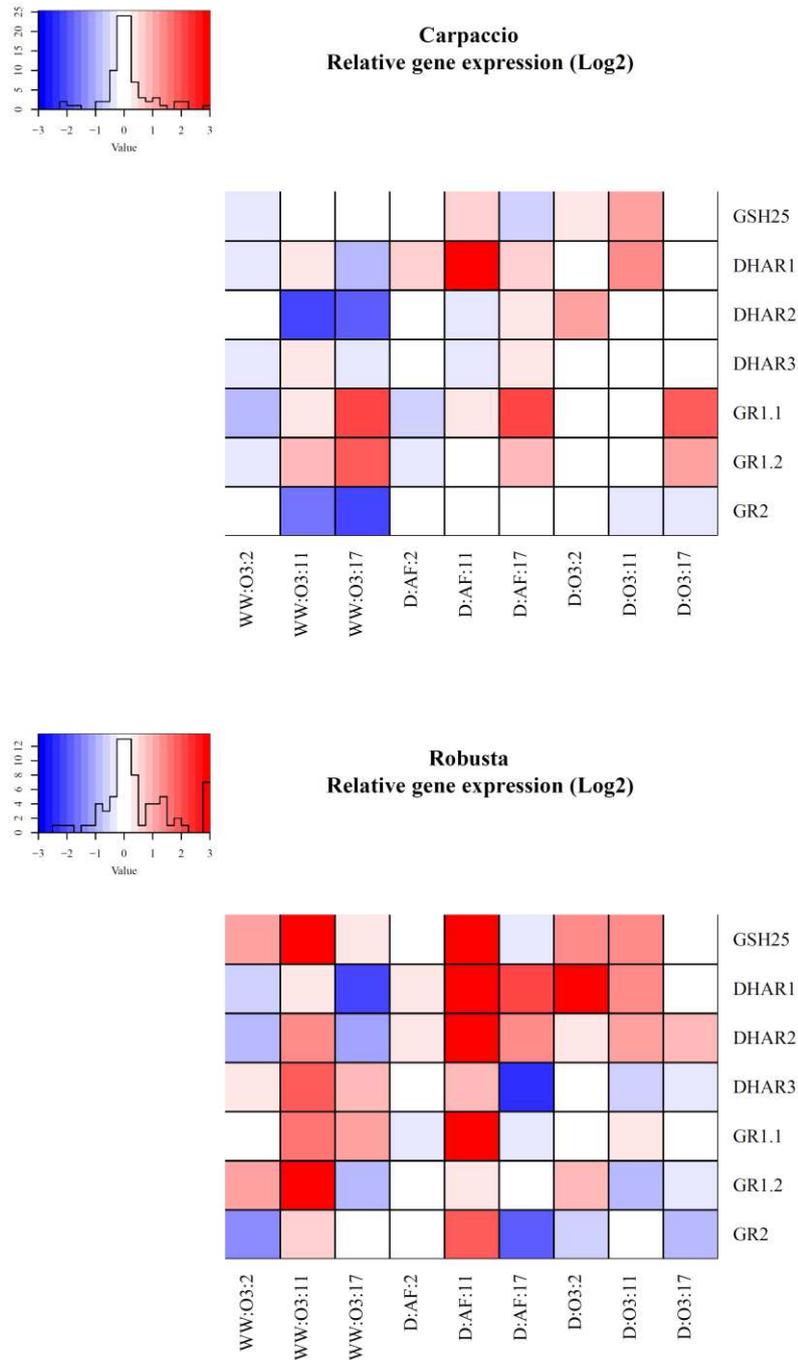


Figure 37 : Ozone- or/and water deficit- driven regulation of gene expression for genes encoding the enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle. The differential transcript accumulation in the Carpaccio and Robusta poplar genotypes at different treatment times (2, 11, and 17 days) is given as 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; O₃, 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:O₃), MDHAR and GR activity profiles were quite similar to the ones observed in WW:O₃ conditions for both genotypes. However, GR activity reached an intermediary level between the WW:O₃ and WW:AF conditions. The same observation was made on gene expression profiling: fold changes were lower than under O₃ 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:O₃ conditions in either genotype. In Carpaccio, *DHAR1* and *DHAR2* expression were less induced under D:O₃, than under O₃ 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:O₃ and D:AF and slightly up-regulated under the D:O₃ treatment in Robusta.

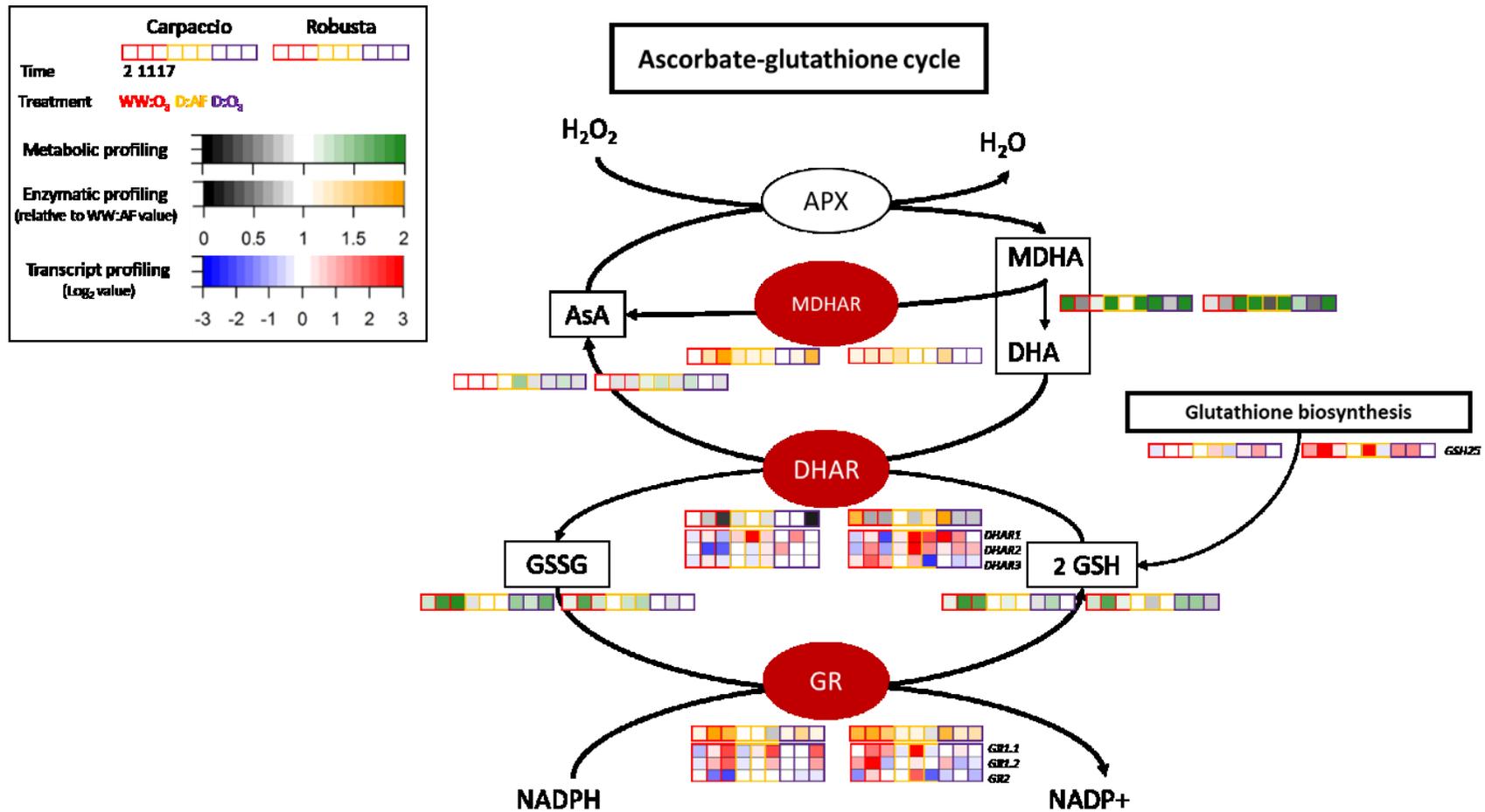


Figure 38 : Integrated analysis of the impact of ozone or/and water deficit on the ascorbate-glutathione cycle. The ozone- or/and water deficit-induced changes in transcript abundance, enzyme activities, reduced /oxidised metabolite contents are shown in colour-coded heat maps. For ascorbate, glutathione, 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 O₃ on the ascorbate-glutathione cycle (Figure 38). The AsA content was not impacted by O₃ 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:O₃-) 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 O₃ exposure. Robusta exhibited larger necrotic injuries and a greater leaf loss than Carpaccio for a similar O₃ flux through the leaves (POD₀) (Dghim et al., 2013). In our experiment, POD₀ 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 O₃ 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 O₃ response in both genotypes. However, as Robusta closed its stomata earlier, we can hypothesise that for a higher O₃ influx, Carpaccio alleviated the negative impact of the oxidative stress although it took in more O₃ 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 O₃ 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 O₃ (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 POD₀ 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 POD₀, in Robusta than in Carpaccio.

Interestingly, the decrease in DHAR activity was clearly linked to transcriptional modulation in both genotypes, as O₃ 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 O₃. 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, O₃ 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 O₃ 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 O₃

(Eltayeb et al., 2007, 2006). In wheat, the differential sensitivity to O₃ 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 O₃ 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 POD₀ 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 O₃ exposure. Higher GSH contents and *GR* expression levels were also reported in O₃-tolerant poplar genotypes (Di Baccio et al., 2008). Interestingly, in their work, *GR* isoforms showed distinct patterns of induction in response to O₃ 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 O₃ 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 O₃ 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 POD₀ 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 O₃-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_i (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 CO₂ assimilation. As g_w decreased and CO₂ 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 O₃, 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 O₃ 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:O₃ 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 O₃ on CO₂ assimilation, which may have resulted from a lower POD₀ for the combined treatment as compared to O₃ alone, for both genotypes. This lower POD₀ in the combined treatment than with O₃ alone likely resulted in an intermediate oxidative stress between the single effects of water deficit and O₃. Regardless of the regulation of the ascorbate-glutathione cycle in the D:O₃ 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 O₃ 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 POD₀. For example, the linear threshold might apply to Total AsA without reaching a phytotoxic O₃ 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 O₃ and water deficit could be translated into different ways on these models and depends on the parameter considered. Firstly, the combined effect of O₃ 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 O₃ doses in interaction with water deficit could allow verifying these assumptions.

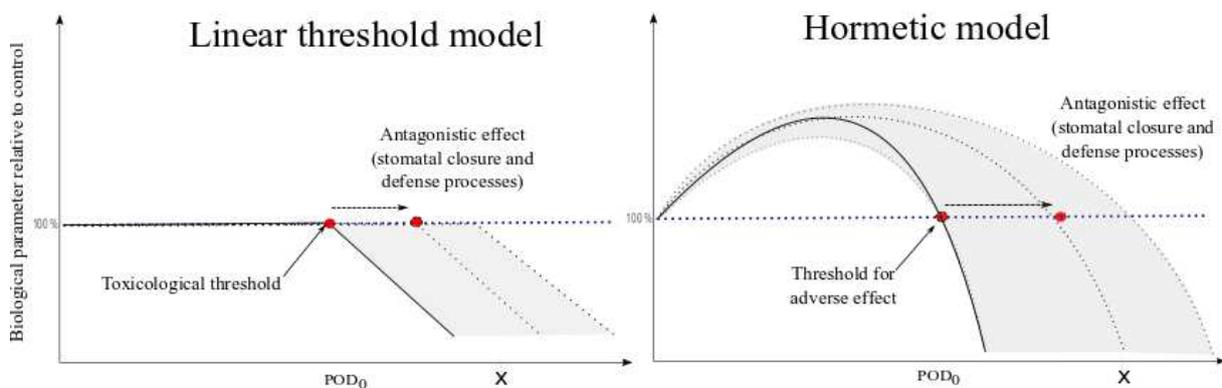


Figure 39 : Theoretical representation of the evolution of biological parameters relative to control with POD₀ as ozone dose. This representation adapted from Agathokleous et al. (2018) compared two ozone dose-response models (continuous line), the linear threshold model (A) versus the biphasic dose 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 O₃ 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 O₃ 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 phytotron chamber conditions. Combined with O₃ 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 POD₀ 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-known 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'O₃ 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 O₃-FACE (*Free-air concentration enrichment*). L'étude concernait la réponse de trois espèces de chênes soumis à l'O₃ 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 O₃-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'O₃ (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^{er} 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 O₃ 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 $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

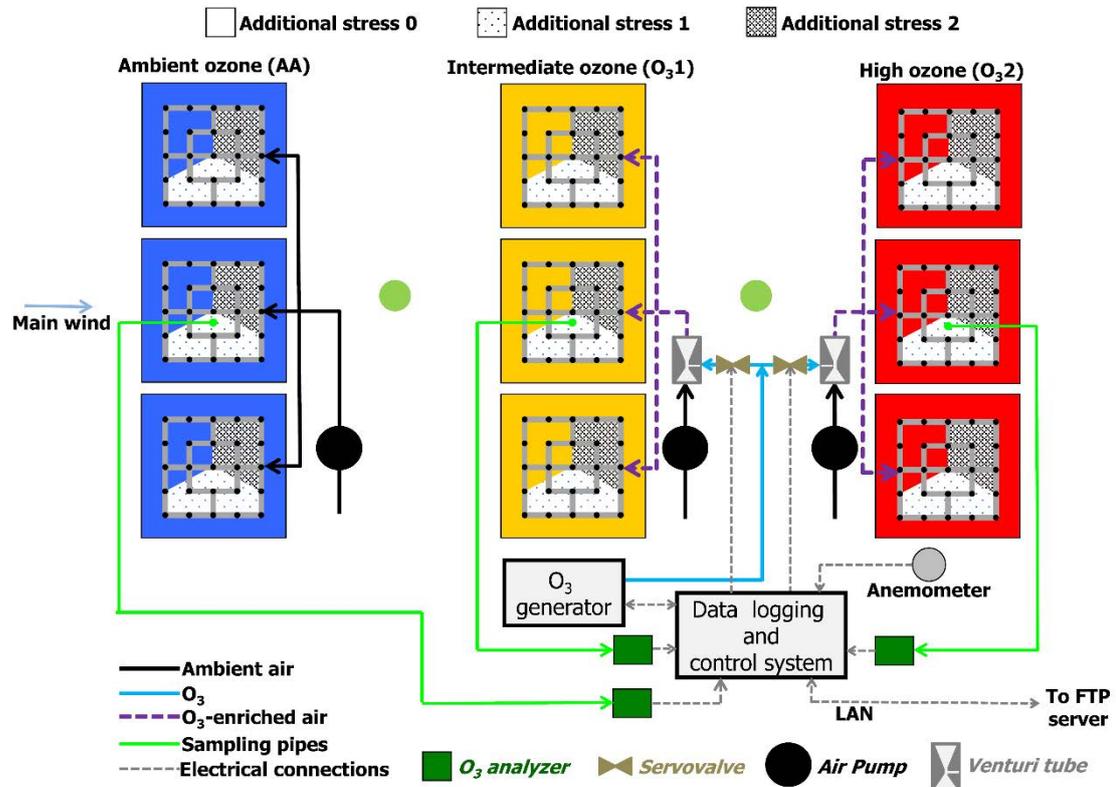


Figure 40 : Schéma du dispositif O₃-FACE (Florence, Italie) issu de Paoletti et al. (2017). Sur fond bleu, le traitement O₃ ambiant (AA) ; sur fond jaune, le traitement $1.2 \times$ AA ; et sur fond rouge, le traitement $1.4 \times$ AA. L'intensité du traitement sécheresse (Additional stress) est indiquée 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' 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' 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' 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
O₃	2	**	ns	***	ns	ns	ns
Water availability	2	ns	ns	**	ns	ns	ns
Plant species	2	***	**	***	ns	ns	**
O₃ × water availability	4	*	ns	***	ns	ns	ns
O₃ × plant species	4	ns	ns	ns	*	*	ns
Water availability × plant species	4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
O₃ × water availability × plant species	8	*	ns	*	ns	ns	ns

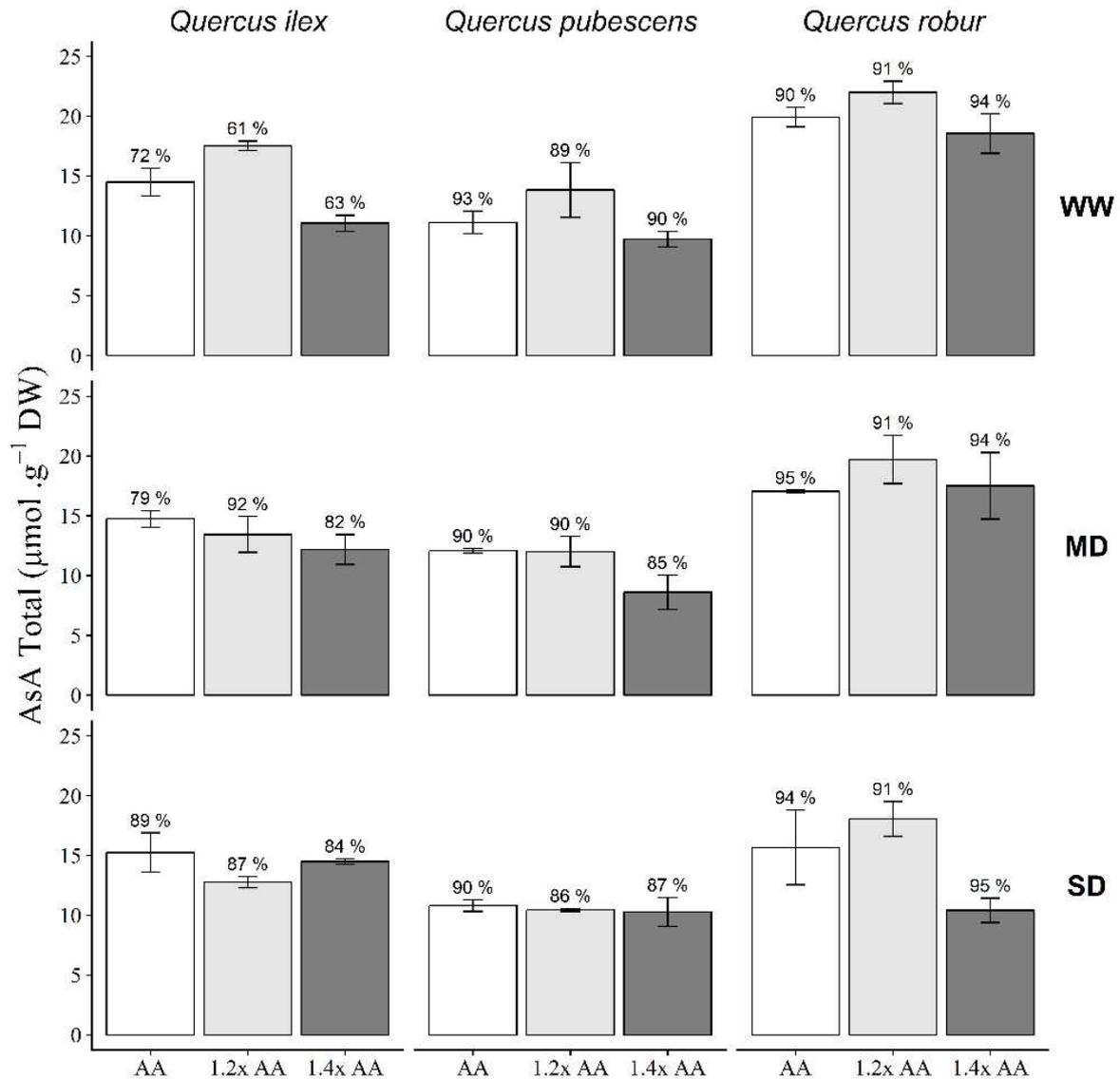


Figure 41: Quantification du contenu en ascorbate total en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (DW) dans les feuilles de *Quercus ilex*, *Q. pubescens* et *Q. robur* exposées à l' O_3 (air ambiant (AA), $1.2 \times \text{O}_3$ ambiant, $1.2 \times \text{AA}$ et $1.4 \times \text{AA}$) 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.

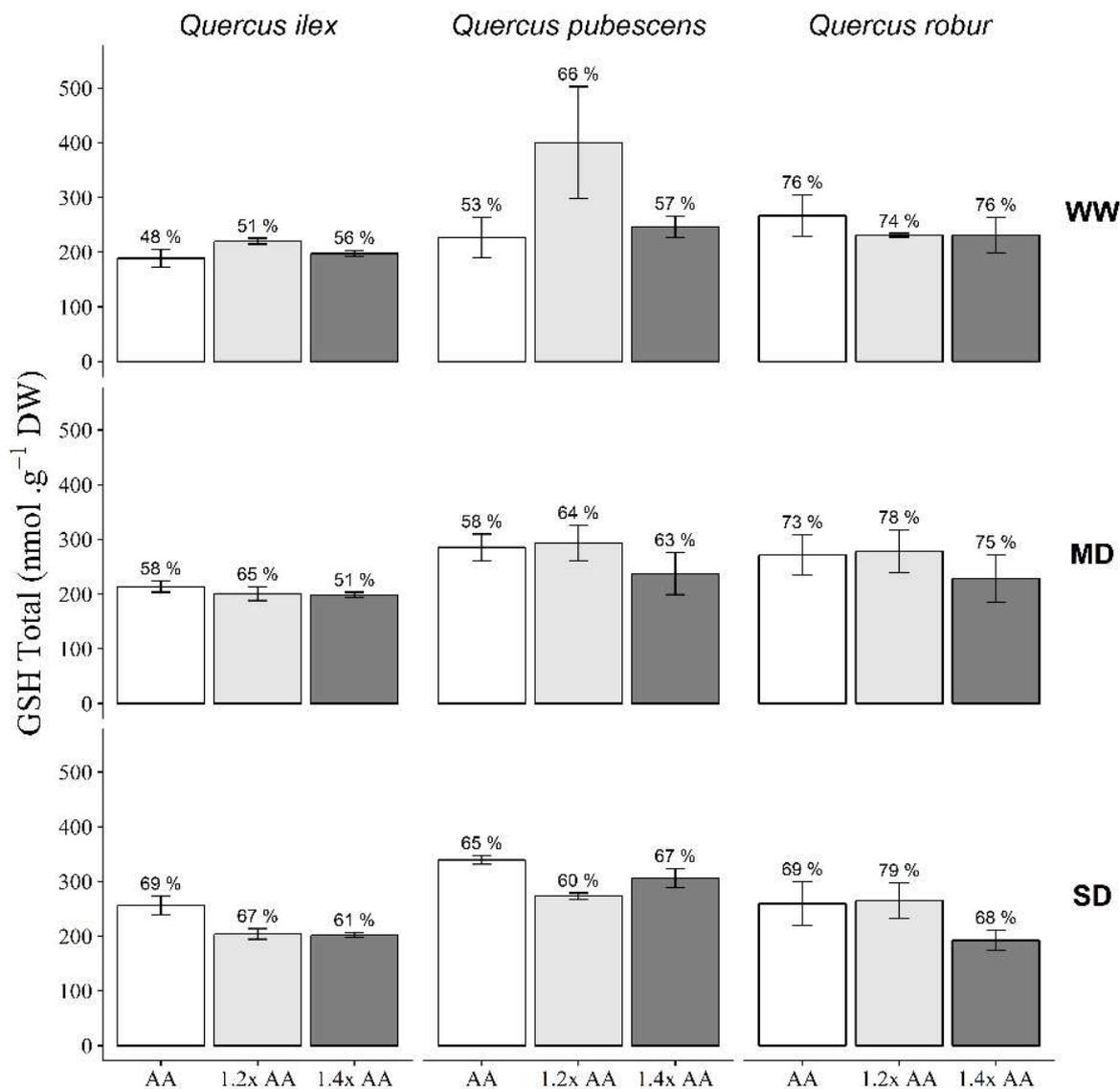


Figure 42: Quantification du contenu total en glutathion (GSH) exprimé en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de matière sèche (DW) dans les feuilles de *Quercus ilex*, *Q. pubescens* et *Q. robur* exposées à l'O₃ (air ambiant (AA), $1.2 \times \text{O}_3$ ambiant et $1.4 \times \text{O}_3$ ambiant $1.2 \times \text{AA}$ 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⁻¹ DW, respectivement pour *Q. pubescens*, *Q. robur* et *Q. ilex*. D'après les résultats d'ANOVA à trois facteurs, l'O₃ 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 O₃ 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.

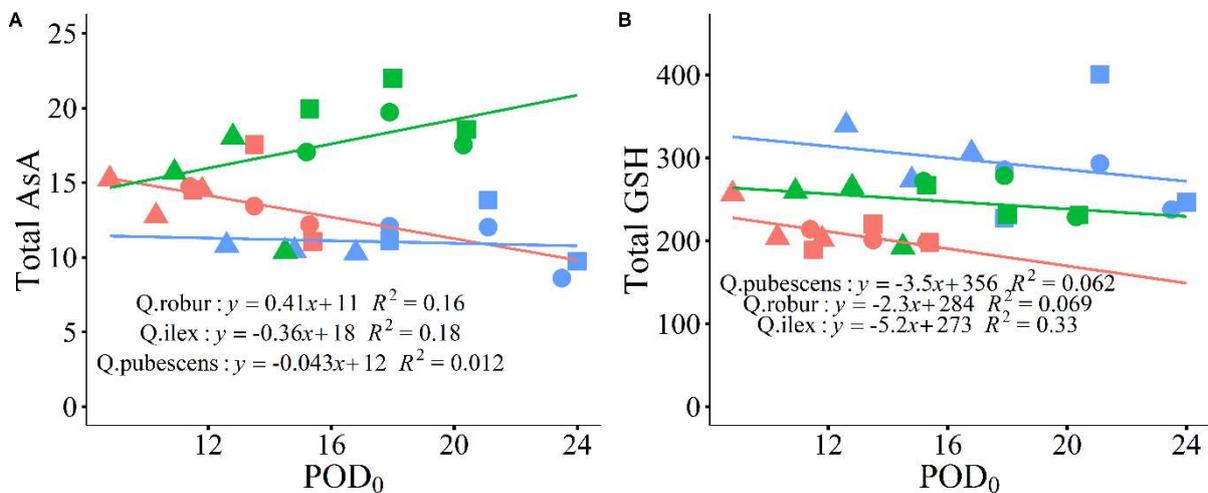


Figure 43 : Contenus totaux en (A) ascorbate et (B) glutathion, exprimés en fonction de l'indice Phytotoxique ozone dose above a threshold of 0 nmol.mm⁻² (POD₀) pour *Q. ilex* (rouge), *Q. robur* (vert) et *Q. pubescent* (bleu). La forme correspond au régime hydrique : triangle, well-watered (WW); rond, moderate drought (MD) et carré, severe drought (SD).

En relation au POD₀, le flux d'O₃ 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 POD₀, 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 POD₀ d'environ 14 mol.m⁻² pour *Q. Ilex*, 17 mol.m⁻² pour *Q. Robur* et 22 mol.m⁻² 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 O₃-Face mis en place en Italie, l'évolution de la biomasse de *Q. ilex* et *Q. pubescent* en fonction du POD_y 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'O₃ et/ou au traitement sécheresse induisent une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 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 H₂O₂ 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'O₃ 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'O₃, sûrement grâce à la fermeture des stomates, présente un POD₀ plus faible au terme des 4.5 mois d'exposition à l'O₃. 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 O₃ 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'O₃ 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'O₃. Les quelques expérimentations réalisées avaient pour cadre une exposition à des concentrations élevées d'O₃ (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, O₃ 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 (O₃, sécheresse et la combinaison des deux). Plusieurs paramètres liés aux conditions de stress O₃ et sécheresse sont présentés dans le Tableau 8. La 10^e 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^{er} 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'O₃ et à la sécheresse. Exposition moyenne à l'O₃ représentée par deux indicateurs, le SUM00 (sum of hourly O₃ 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; O₃: ozone. Le potentiel hydrique de base (ψ_{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 ⁻¹)	AOT40 (ppm.h ⁻¹)	REW moyen (%)	Water used (L)	ψ_{base} (MPa)
WW	FA	0.734	0	85.6 ± 9.3	4.65	-0.40 ± 0.07
	O ₃	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 ₃	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'O₃ 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 O₃ et déficit hydrique n'est cependant pas significative sur l'ensemble des paramètres de croissance (Tableau 9).

Tableau 9 : Impacts de l'O₃ 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; O₃: 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 ₃	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 ₃	67.12	±1.02	7.77	±0.11	28.5	±0.51	13.39	±0.47	5.62	±0.19
D		0.058		<.001		0.463		0.009		0.355	
O ₃		0.25		0.97		0.843		0.688		0.049	
D x O ₃		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'O₃ (WW:O₃ et D:O₃), 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'O₃ (WW:O₃ et D:O₃) 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'O₃ (WW:O₃ et D:O₃, Figure 45). Pour le traitement D:FA, la coloration semble révéler la présence de H₂O₂ le 11^e jour.

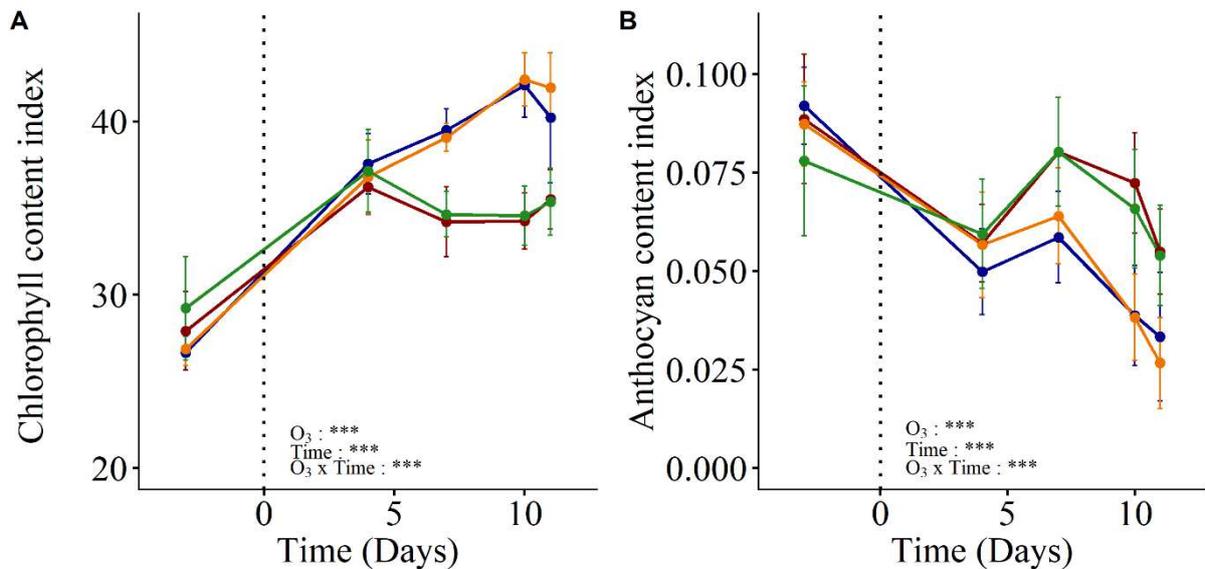


Figure 44 : Cinétique de réponse de la teneur en chlorophylles (A) et en anthocyanes (B) chez Robusta, soumis à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. Moyenne ± se, n= 4. La significativité statistique des facteurs ou de l'interaction est indiquée (***, $P \leq 0.05$). WW:FA (contrôle) : bleu ; D:FA (déficit hydrique et air filtré) : jaune ; WW:O₃ (bien hydraté et ozone) : rouge ; D:O₃ (déficit hydrique et ozone) : vert. La ligne pointillée au temps 0 marque le début de la fumigation.

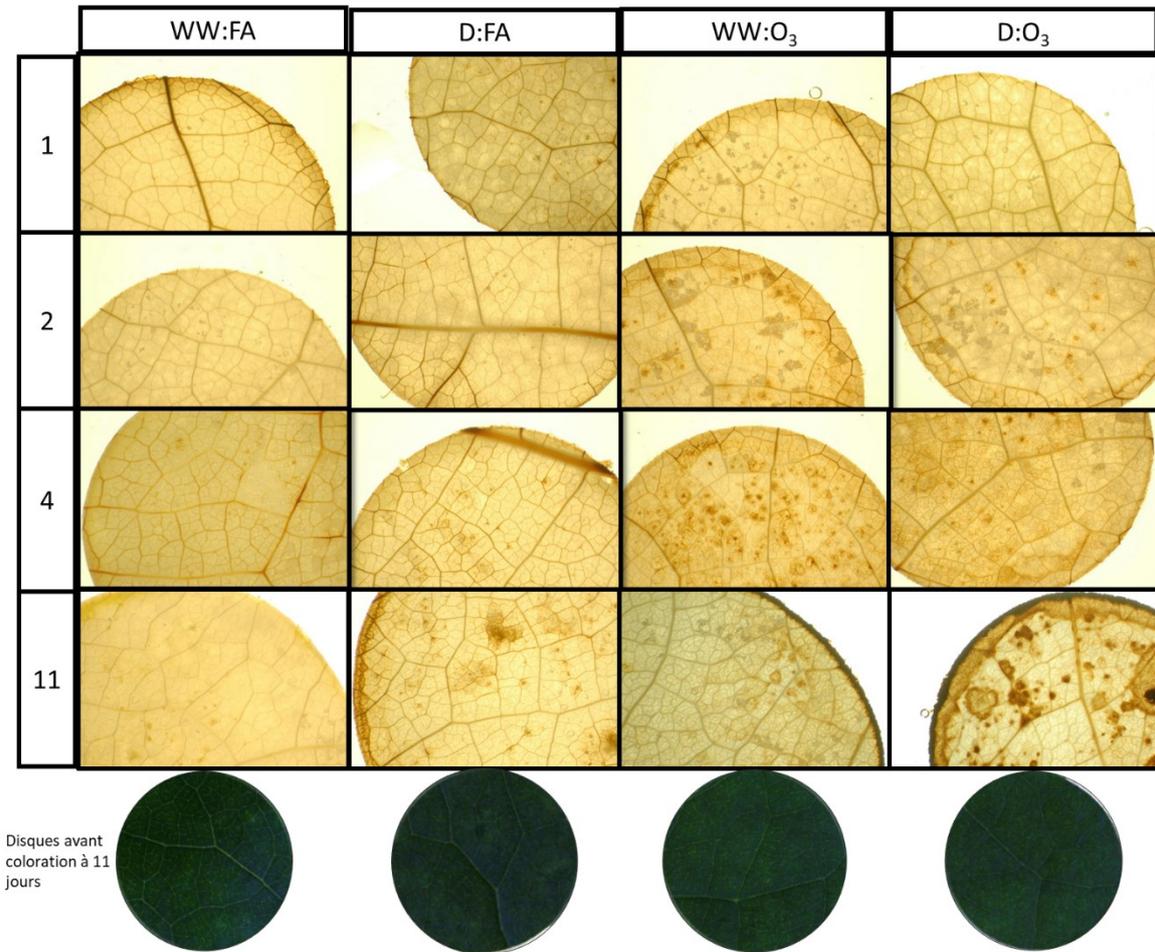


Figure 45: Cytolocalisation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la technique de coloration au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) pour les arbres soumis aux traitements O₃ et/ou déficit hydrique à 1, 2, 4 et 11 jours de traitement. Le DAB oxydé par H₂O₂ forme des précipités marrons. WW:FA : bien hydraté et air filtré (contrôle) ; D:FA : déficit hydrique et air filtré ; WW:O₃ : bien hydraté et ozone ; D:O₃ : déficit hydrique et ozone.

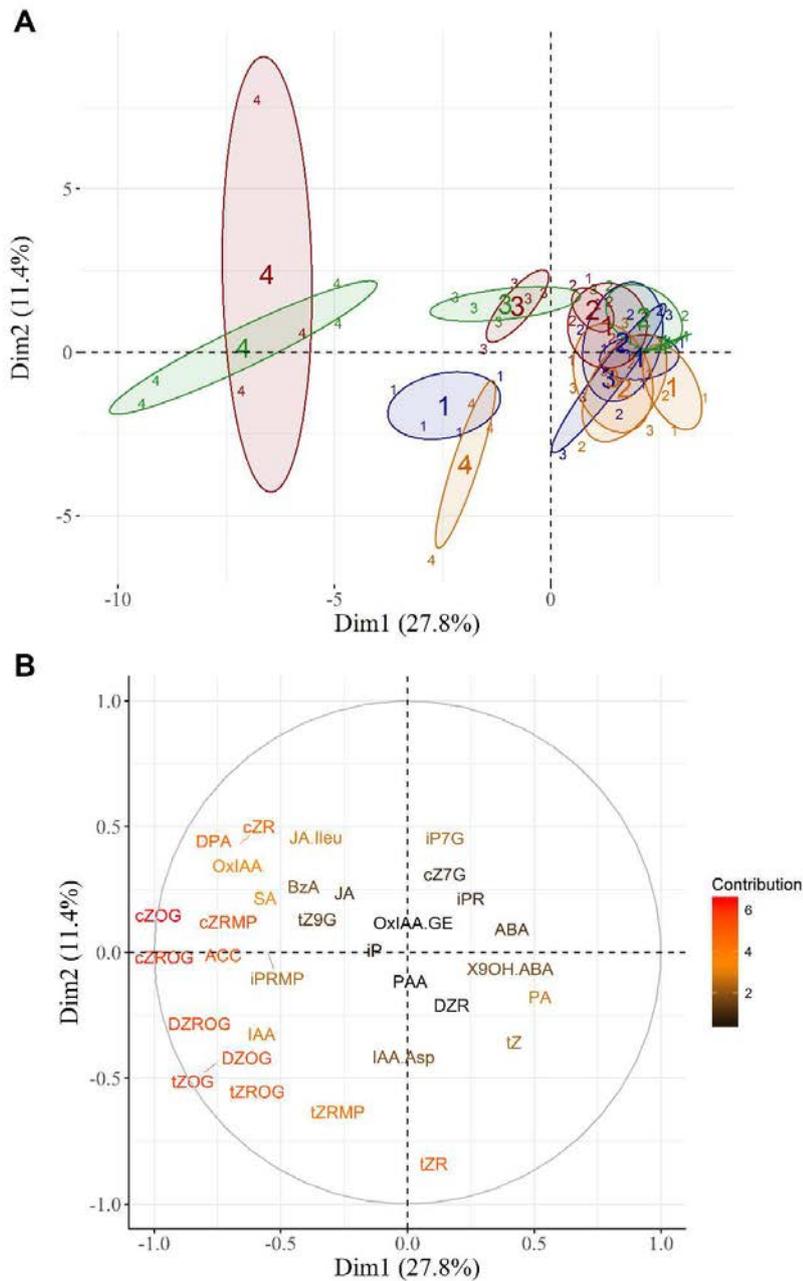


Figure 46 : Analyse en composantes principales de la distribution des échantillons (A) en fonction de la corrélation de 32 phytohormones (B) sur un plan factoriel à deux dimensions. Les phytohormones ont été déterminées pour le génotype Robusta lors de 4 dates, 1, 2, 4 et 11 jours, représentées respectivement par les chiffres 1, 2, 3 et 4. Les ellipses (intervalles de confiance 95 %) correspondent aux différentes combinaisons de traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, 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 O₃ présent sur cet axe (Tableau 10). L'axe deux (Dim. 2), quant à lui, répond à l'O₃ 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 O₃. 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'O₃ et/ou au déficit hydrique.

Tableau 10 : Résultats de l'ANOVA à 3 facteurs incluant le déficit hydrique (WD), la fumigation à l'ozone (O₃) 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	0.024
O ₃	1	<0.001	<0.001
Time	3	<0.001	0.228
WD x O ₃	1	0.901	0.719
WD x Time	3	0.338	0.326
O ₃ x Time	3	<0.001	0.095
WD x O ₃ 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.

Fraction A				Fraction B			
	Abreviation	Formule	MW		Abreviation	Formule	MW
<u>Auxins</u>				<u>Cytokinins</u>			
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
<u>Abscisic acid</u>				<u>Cis-zeatin-O-glucoside</u>			
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
<u>Salicylic acid</u>				<u>dihydrozeatin-O-glucoside</u>			
	SA	C7H6O3	138.12	dihydrozeatin riboside -O-glucoside	DZOG	C16H25N5O6	383.41
				dihydrozeatin riboside -O-glucoside	DZROG	C21H33N5O10	515.52
<u>Benzoic acid</u>				<u>isopentenyl adenine</u>			
	BzA	C7H6O2	122.12	isopentenyl adenine	iP	C10H13N5	203.25
				isopentenyl adenosine	iPR	C15H21N5O4	335.37
<u>Jasmonates</u>				<u>isopentenyl adenine-7-glucoside</u>			
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
				1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	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:O₃), 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'O₃ tend à diminuer la teneur en ABA de manière non significative, mais augmente celle du DPA le 11^e jour. En effet, pour les deux traitements ozone (WW:O₃ et D:O₃), les teneurs en DPA restent inférieures à 250 pmol.g⁻¹ MS les 3 premiers temps de mesure, puis atteignent 610 pmol.g⁻¹ MS le 11^e jour.

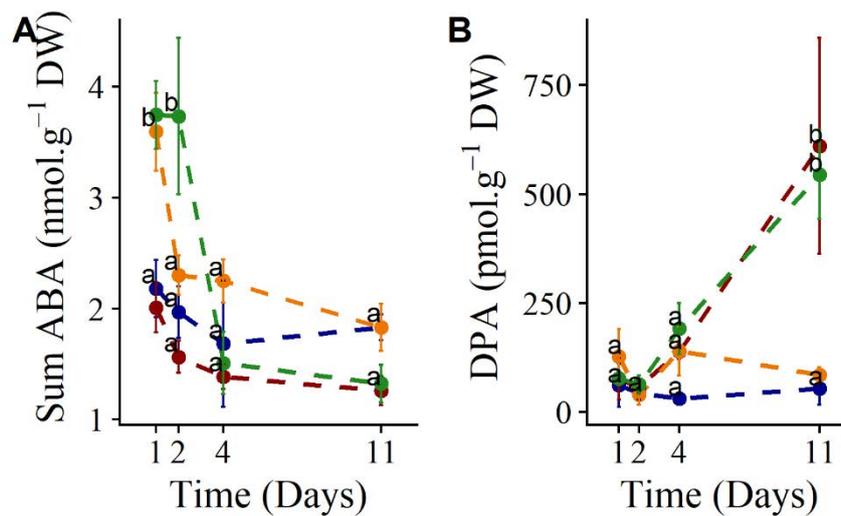


Figure 47 : Evolution des teneurs en acide abscissique (ABA) et en acide dihydrophaséique dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. (A) La somme des teneurs en ABA, correspondant à la somme de l'acide abscissique (ABA), de l'acide phaséique (PA) et du 9-hydroxy-ABA (9OH-ABA), et (B) la teneur en dihydrophaséique acide (DPA) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, 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 O₃ (WW:O₃ et D:O₃), 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⁻¹DW 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).

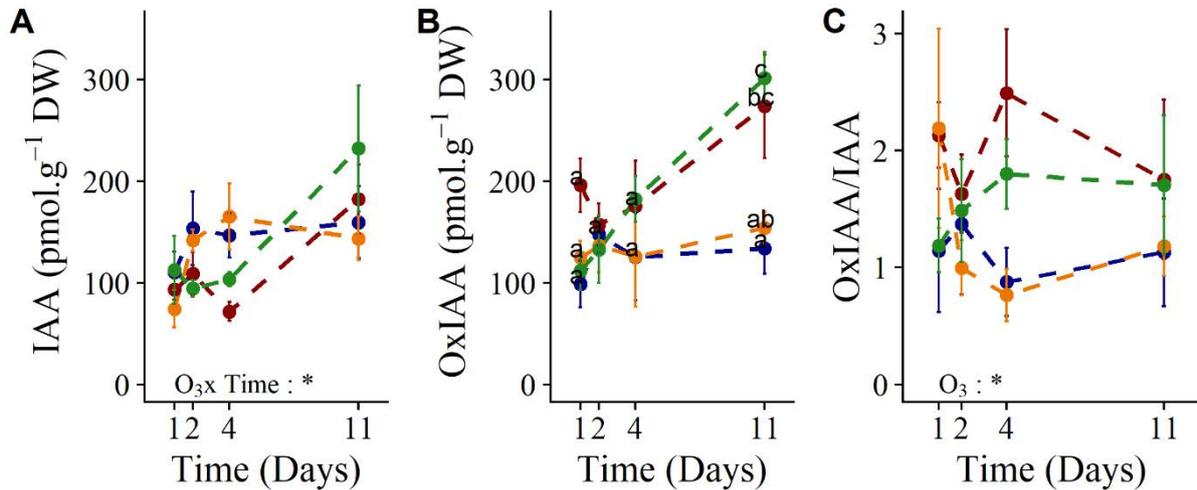


Figure 48 : Evolution des teneurs en IAA et OxIAA dans les feuilles de Robusta, soumises à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. Les teneurs en IAA (A) et OxIAA (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, vert. Moyenne ± se, n=4. Les lettres 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 O₃, 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⁻¹ 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⁻¹ 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:O₃ (27 nmol.g⁻¹ DW à 11 jours). Sous traitement déficit hydrique seul (WW:AF), le niveau de SA est stable et inférieur à 10 nmol.g⁻¹ 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).

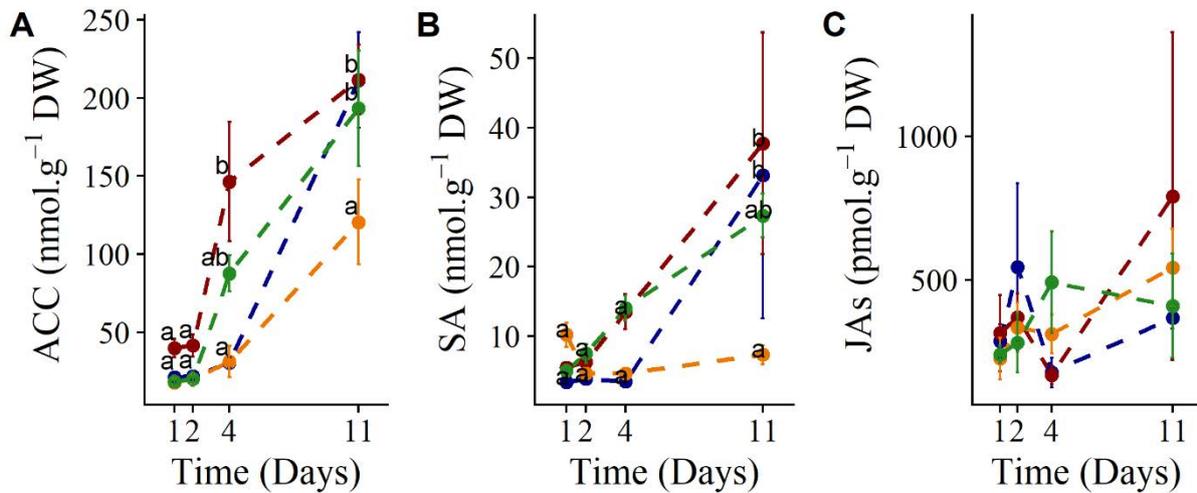


Figure 49 : Evolution des teneurs en ACC, SA et JA dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. Les teneurs en ACC (A), en SA (B) et en JAs (C) (somme des JA et JA-isoleu) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, 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).

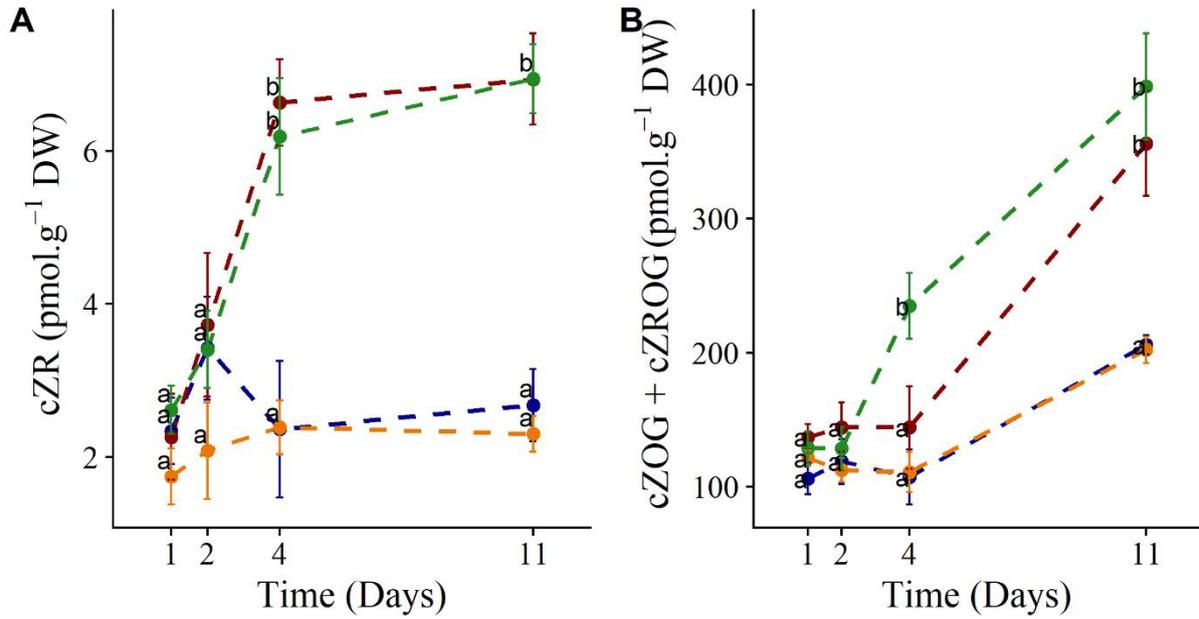


Figure 50 : Evolution des teneurs foliaires en cZR et cZOG+cZROG dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. La teneur en cZR (A) et la somme des teneurs des formes désactivées réversibles (cZOG et cZROG) (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, 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.

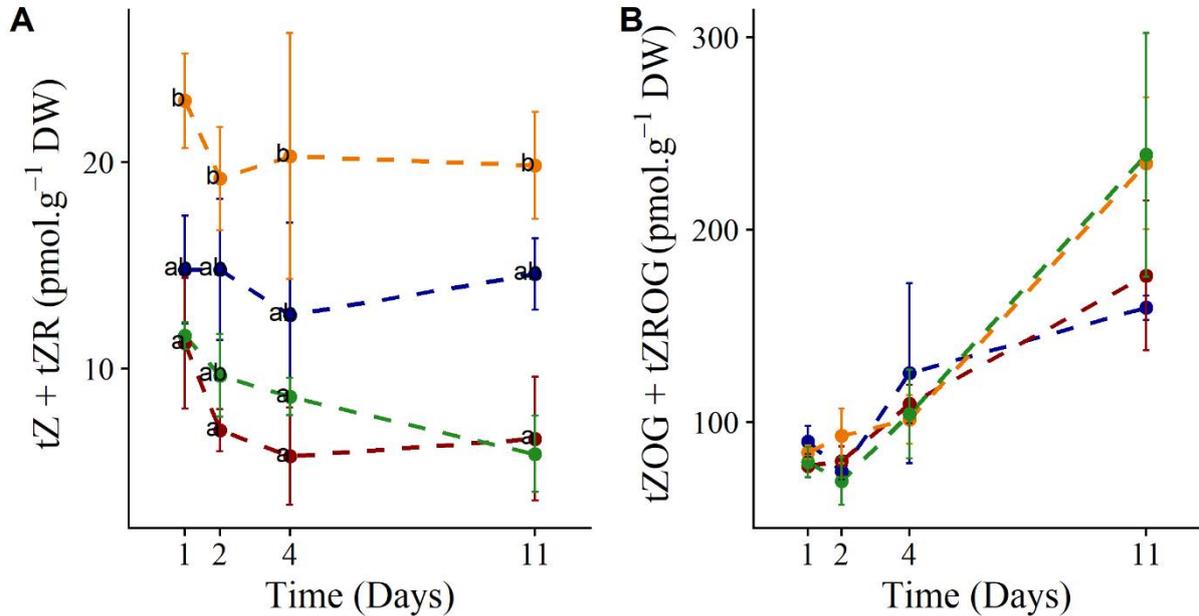


Figure 51 : Evolution des teneurs foliaires en tZs et leurs formes désactivées réversibles dans les feuilles de Robusta, soumis à l'O₃ et/ou au déficit hydrique. La teneur en tZs (tZ + tZR) (A) et la somme des teneurs des formes désactivées réversibles (tZOG et tZROG) (B) ont été déterminées à 4 temps de prélèvement. Traitements : WW:AF, bleu ; WW:O₃, rouge ; D:AF, orange ; D:O₃, 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 O₃ : la teneur triple entre le 1^{er} et le 4^e jour. Le 11^e jour, les teneurs sont identiques au 4^e (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⁻¹ DW (Figure 50, A). Les formes désactivées de cis-zéatine (cZOG+cZROG) sont également modifiées au cours des traitements O₃, 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^e et le 11^e jour, tandis que, sous traitement ozone, l'augmentation est de 130 à 370 pmol.g⁻¹ 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^{er} jour. Les plants soumis à l'O₃ (D:O₃ et WW:O₃), 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:O₃), leur teneur double entre le 4^e et le 11^e 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^e et le 11^e 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 O₃

Comme décrit précédemment, l'O₃ 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 (H₂O₂) semble indiquer un stress oxydant dès 2 jours. La chute des feuilles, les modifications des teneurs en pigments et la présence d'H₂O₂ sont donc des indices du stress oxydant dû à l'O₃.

Les effets du gaz phytotoxique sur les phytohormones dépendent fortement de la nature de celles-ci. En effet, l'O₃ 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'O₃ (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'O₃ 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 O₃ (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 O₃ 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'O₃ 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'O₃. Il est en effet connu que la triade éthylène-SA-JA joue un rôle dans la signalisation du stress O₃ 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 O₃ 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 O₃ 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'O₃, 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'O₃, 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'H₂O₂ 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 O₃.

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 O₃ 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'O₃ 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'O₃ 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 H₂O₂ 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'O₃ seul.

L'évolution des différentes hormones au cours de la combinaison de contraintes suit les profils observés pour les deux traitements indépendants (WW:O₃ 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 O₃ seul. Cette observation pourrait être liée à une signalisation spécifique, elle-même liée au déséquilibre du statut redox dû à l'O₃, 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 O₃ 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'O₃ 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'O₃ seul. Précédemment, nous avons montré que la fermeture des stomates en condition combinée dépendait du déficit hydrique plus que de l'O₃ ; en d'autres termes, la fermeture des stomates est plus importante sous déficit hydrique que sous O₃ (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'O₃ et donc le stress oxydant.

La modification des voies liées au CKs semble plutôt suivre le profil du traitement O₃ 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 O₃ seul. Le rôle de ces formes de désactivation est cependant encore peu connu (Spíchal, 2012).

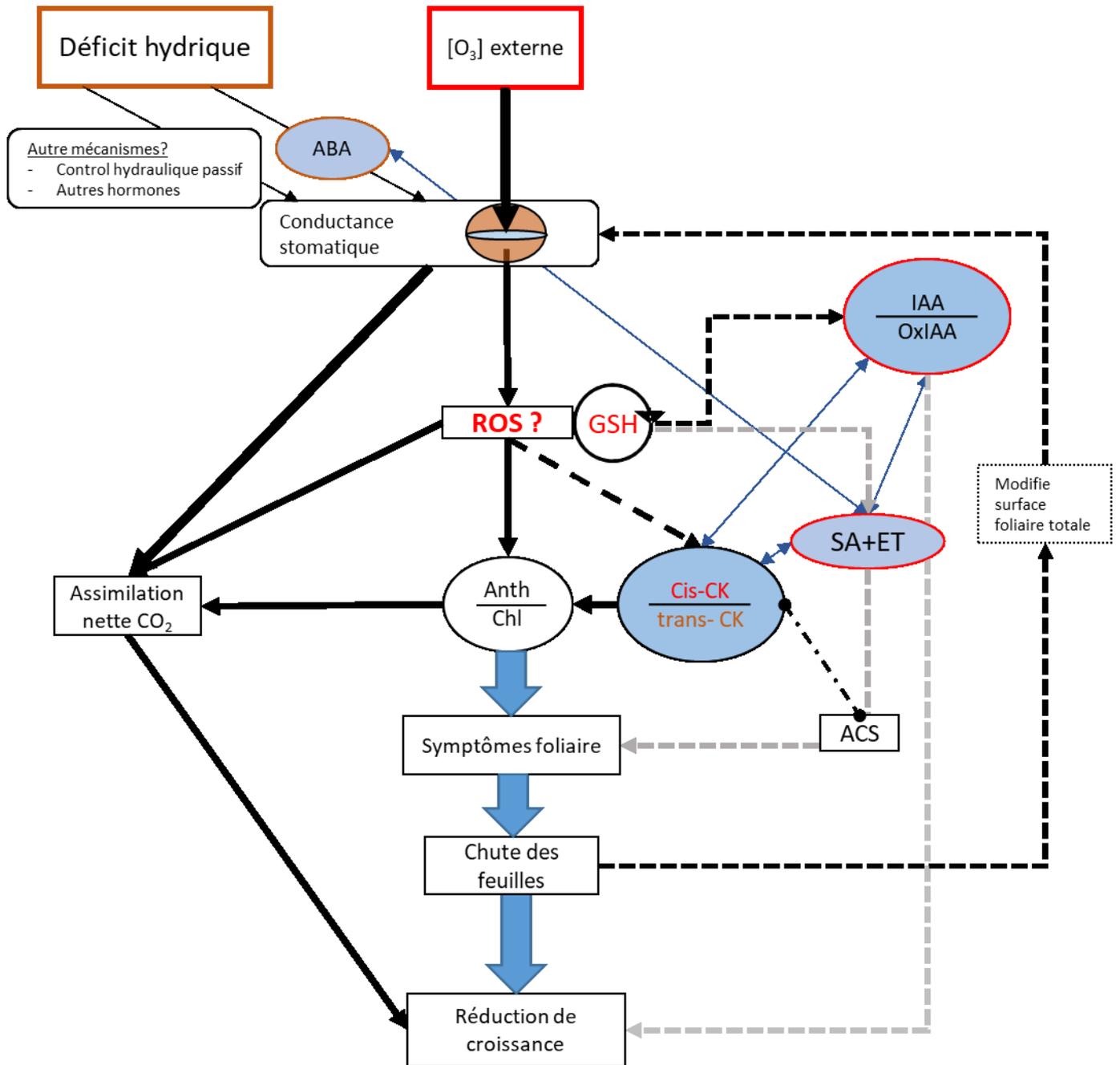


Figure 52 : Bilan schématisique de la réponse hormonale du génotype de peuplier Robusta soumis à l' O_3 et à la sécheresse. La taille des flèches illustre la force de l'effet. Les flèches pointillées symbolisent les relations supposées entre hormones, détoxication et les paramètres suivis par rapport 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'O₃ est plus tardive, probablement en raison d'un effet cumulatif de plus en plus prononcé au cours du temps. Seul, l'O₃ 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'O₃ entrant devrait être moins important que dans le traitement O₃ 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'O₃. 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'O₃ 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'O₃. Caractériser l'effet de la combinaison de l'ozone et du déficit hydrique doit passer par la caractérisation du flux d'O₃ entrant. Néanmoins, il est vrai que, à stress oxydant induit par l'O₃ 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'O₃, 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'O₃ 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'O₃. 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 O₃. (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'O₃ 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 O₃ 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
<u>Abscisic acid</u>					
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
<u>Jasmonate</u>					
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
<u>Auxin</u>					
Potri.006G243400.1	<i>YUCCA2</i>	CGCCTTCACTTACCGAAACA	CGCCAAAACCCGATAGCTTT	Biosynthesis	Royer et al., 2016
<u>Cytokinins</u>					
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
<u>Salicylic acid</u>					
Potri.006G148100	<i>NPR1</i>	CCCAGTTCACAGGTGCATTT	TGCTACCCCACTTCTGTCTT	Transcription factor	
Potri.007G100600.1	<i>PAD4</i>	CGAAAGATGGGGTGGCAAAT	GTCCACACAAATTGCTCCGT		Janda et Ruelland, 2015
<u>MAPK</u>					
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'O₃. 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 O₃, 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'O₃ 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'O₃ 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'O₃ 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
