

UNIVERSITE PARIS EST-CRETEIL VAL DE MARNE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

THESE

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris-Est
Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement

Présentée par :
Ahmed RAKMANI

**Impact sur les paramètres agronomiques et
physiologiques de l'ozone troposphérique sur le maïs en
Ile-de-France**

Direction de thèse et encadrement : Anne Repellin, Professeur.
Co-encadrement : Luis Leitao, Maître de conférences.
Université Paris Est-Créteil, Equipe iEES Paris



Vulnerability to Ozone in Anthropized Ecosystems
A Project funded by the French National Research Agency
(2009-2013)

Soutenue le 15 décembre 2015, devant le jury composé de :

Jean Christophe Avice	Pr., Université de Caen	Rapporteur
Juliette Leymarie	MC, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Jean-Francois Castell	MC, AgroParisTech	Examineur
Giacomo Gerosa	Pr. Associé, Université C. de Brescia	Examineur
Daniel Laffray	Pr., Université Paris Est Créteil	Examineur
Anis Limami	Pr., Université d'Angers	Examineur

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Anne Repellin, pour toutes les opportunités qu'elle m'a offertes et la confiance qu'elle m'a témoignée. Merci d'avoir cru en moi alors que je n'étais qu'étudiant et d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier Luis Leitaó qui a codirigé cette thèse. Merci à lui pour son soutien quotidien dans mes péripéties laborantines, pour ses conseils, sa disponibilité et son infinie patience.

Je souhaite remercier Mme Juliette Leymarie, Maître de conférence à l'Université Pierre et Marie Curie et M. Jean Christophe Avice, Professeur à l'Université de Caen, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur malgré un délai très court.

Je remercie également Messieurs Jean François Castel, Maître de conférence à l'AgroParisTech, Anis Limami, Professeur à l'université d'Angers, Giacomo Gerosa, Professeur associé à l'université Catholique de Brescia et Daniel Laffray, Professeur à l'Université Paris Est Créteil.

Merci à Mme Marie-Claire Gazeau et M. Denis Duhamel, directeurs de l'école doctorale SIE, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse et à Brigitte David pour sa bonne humeur, sa patience, son humour et pour avoir toujours su trouver les solutions à mes problèmes administratifs.

Merci à nos collègues de l'INRA de Grignon, Messieurs Olivier Bethenod et Jean François Castel pour leur précieuse aide et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.

Je tiens à remercier le Pr. Yasmine Zuily Fodil pour avoir su stimuler ma soif de connaissances.

Je remercie à nouveau le Pr. Daniel Laffray, un mentor, un monument, un intarissable puits de savoir qui jusqu'au bout m'aura sauvé la mise...

Je remercie Matthieu, pour être bien plus qu'un collègue et m'avoir fait profiter de son spectre de connaissances qui ne semble pas avoir de limites, Christophe pour son sens du protocole autant que pour sa bonne humeur, Manuel pour son pragmatisme et nos discussions stimulantes.

Un incommensurable merci à Mme Juliette Rochet, pour être Juliette Rochet, qui restera pour moi un modèle de compétences, d'humanité et d'humilité.

Un merci des plus raisonnables pour Ruben et Marien, parce que je sais qu'ils n'affectionnent pas ces démonstrations de gratitude, merci pour tous les rires et l'aide que vous m'avez apportés.

Une pensée également toute particulière pour Mme Grekis et Mme Martin pour qui mille mercis ne seraient pas suffisants.

Je tenais également à remercier tous les collègues de labo que je n'ai pas cités mais qui ont d'une manière ou d'une autre contribué à cette thèse, en vrac et de manière non exhaustive, Mireille, Eric, Xavier, Corinne, Charlotte, Tetiana, Pascal, Déborah...

Merci à mes chiens Talia et Tao qui ont veillé à ce que je prenne l'air au moins une fois par jour, à mes chats, Bounty pour m'avoir laissé en paix pendant les longues heures de rédaction et Leinhardt pour m'avoir rappelé de sauvegarder mes progressions en se couchant sur le clavier.

Je remercie également ma famille qui a toujours cru en moi et particulièrement mes parents à qui je dois tant, les mots ne suffiront jamais pour leur exprimer ma gratitude.

Enfin, merci à celle qui au quotidien veille sur moi, croit en moi et me soutient, celle sans qui cette thèse n'aurait ni pu aboutir ni même commencer. Merci Mélanie pour m'avoir accompagné au cours de cette aventure et toutes mes autres folies.

SOMMAIRE

I] Introduction	1
II] Synthèse bibliographique	4
II]-1 Le maïs	4
II]-1-1 Généralités	4
II]-1-2 Exigences climatiques	5
II]-2 Plantes et changement climatique	6
II]-2-1 Plantes et CO ₂	7
II]-2-2 Plantes et température	9
II]-2-3 <i>Plantes et sécheresse</i>	10
II]-3 L'ozone atmosphérique	11
II]-3-1 L'ozone stratosphérique	12
II]-3-2 L'ozone troposphérique	14
II]-3-2-1 Formation	14
II]-3-2-2 Répartition de l'ozone troposphérique	15
II]-3-2-3 Evolution des concentrations en ozone troposphérique	16
II]-4 Impact de l'ozone troposphérique sur la santé humaine	18
II]-5 Impact de l'ozone troposphérique sur les couverts végétaux.....	19
II]-5-1 Phénologie et sensibilité à l'ozone	21
II]-5-2 Impact de l'ozone troposphérique sur le maïs	21
II]-5-3 Symptômes foliaires	23
II]-5-4 Effets «cellulaires».....	25
II]-5-4-1 Entrée de l'ozone dans les feuilles	25
II]-5-4-2 Systèmes antioxydants : détoxification des ros	27
II]-5-5 Régulation hormonale	29
II]-5-5-1 Ethylène.....	29
II]-5-5-2 Acide salicylique	30
II]-5-5-3 Acide jasmonique	31
II]-5-5-4 Acide abscissique.....	32
II]-6 Modification des protéines en réponse aux stress oxydants	32
II]-6-1 Evolution des teneurs en protéines carbonylées durant le développement foliaire	34
II]-6-2 Evolution du niveau de protéines carbonylées dans les feuilles en réponse à un stress abiotique	35
II]-7 Protéolyse chez les plantes.....	36
II]-7-1 Mécanisme d'action des protéases et classes de protéases	36
II]-7-2 Protéases à cystéine	37
II]-7-3 Protéolyse et ozone.....	38
III] Objectifs	40

IV] Matériels et méthodes	42
IV]-1 Site expérimental	42
IV]-2 Système de fumigation et condition d'exposition à l'ozone	42
IV]-3 Indice d'exposition à l'ozone	44
IV]-4 Matériel végétal et culture du maïs	44
IV]-4 1 Prélèvements des échantillons végétaux	45
IV]-5 Paramètres agronomiques	46
IV]-5-1 Estimation des surfaces foliaires sur le maïs	46
IV]-5-2 Quantification des Biomasses aériennes.....	46
IV]-5-3 Détermination de la teneur en amidon dans les caryopses	47
IV]-5-4 Détermination des teneurs en carbone et azote dans les tiges, feuilles et grains.....	47
IV]-6 Paramètres physiologiques	47
IV]-6-1 Mesure des teneurs en chlorophylles totales	47
IV]-6-2 Mesure des échanges gazeux.....	48
IV]-7 Paramètres Biochimiques.....	48
IV]-7-1 Extraction des protéines foliaires solubles et mesures des activités endoprotéolytiques	48
IV]-7-1-1 Extraction	48
IV]-7-1-2 Mesure des activités endoprotéolytiques totales.....	49
IV]-7-1-3 Evaluation des activités spécifiques au moyen d'inhibiteurs.....	50
IV]-8 Dosage des espèces réactives de l'oxygène foliaires dans l'extrait.....	51
IV]-9 Evaluation de l'oxydation des lipides par la méthode thiobarbituric acid-reactive-substances (TBARS)	52
IV]-10 Extraction des protéines foliaires solubles et détermination du niveau de carbonylation des protéines	54
IV]-10-1 Extraction	54
IV]-10-2 Détermination du niveau d'oxydation (groupement carbonyle) d'extraits protéiques foliaires	54
IV]-10-3 Séparation des protéines foliaires solubles par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	55
IV]-10-4 Transfert sur membrane de nitrocellulose et visualisation des protéines oxydées par immunochémiluminescence	55
IV]-10-5 Visualisation des protéines oxydées après coloration au bleu de Coomassie et analyse par densitométrie des signaux acquis	56
IV]-11 Dosage des protéines solubles de feuilles de maïs	56
IV]-12 Analyses statistiques	57
IV] Résultats	58
V]-1 Exposition à l'ozone.....	58
V]-1-1 Fréquence horaire des niveaux d'ozone	58
V]-1-2 Variations des valeurs d'AOT40	59
V]-2 Paramètres de rendement	61

V]-2-1 Poids de 1000 grains	61
V]-2-2 Teneur en amidon dans les caryopses	62
V]-2-3 Détermination du nombre de rangs par épi et du nombre de grains par rang	62
V]-2-4 Rapport C/N dans les feuilles, les tiges (et les caryopses)	63
V]-2-5 Quantification de la biomasse aérienne	66
V]-2-6 Indice de récolte	67
V]-2-7 Surfaces foliaires	68
V]-2-8 Masses surfaciques	69
V]-2-9 Pourcentage de germination	69
V]-3 Paramètres physiologiques	70
V]-3-1 Conductance stomatique et assimilation nette	70
V]-3-2 Teneur en protéines solubles totales dans les feuilles	72
V]-3-3 Teneurs en chlorophylles totales	73
V]-4 Effet de l'ozone sur les activités endoprotéolytique	74
V]-4-1 Détermination du pH optimal pour les mesures d'activités endoprotéolytique totale	74
V]-4-2 Activités endoprotéolytiques totales	75
V]-4-3 Activités protéolytiques spécifiques	76
V]-5 Evaluation des teneurs en ROS dans les feuilles	79
V]-6 Niveau d'oxydation globale des protéines solubles	80
V]-7 Peroxydation lipidique	81
VI] Discussion	83
VI]-1 Niveaux d'exposition à l'ozone	83
VI]-2 Impact de l'ozone sur le rendement	84
VI]-2-1 Arguments en faveur de la tolérance du maïs à l'ozone	84
VI]-2-1 Limites de la relation exposition-réponse pour le maïs	90
VI]-3 Evolution des teneurs en protéines foliaires au cours du développement et en réponse à l'ozone.	91
VI]-4 Impact du stress oxydant induit par l'ozone sur les composants cellulaires de feuilles de maïs	94
VI]-4-1 Evolution du niveau de carbonylation des protéines au cours du développement du maïs et en réponse à l'ozone	94
VI]-4-2 Caractérisation des teneurs en ROS au cours du développement du maïs et en réponse à l'ozone	95
VI]-4-3 Evolution du niveau de peroxydation lipidique au cours du développement du maïs et en réponse à l'ozone	96
VI]-5 Caractérisation de la protéolyse en réponse à l'ozone	97
VI]-5-1 Activités endoprotéolytiques totales	97
VI]-5-2 Activités endoprotéolytiques spécifiques	100
VII] Conclusions et perspectives	101
VII] Bibliographie	105

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Stades de développement du maïs (ressource FAO WATER)	5
Figure 2: Relation entre la photosynthèse nette et la température de la canopée pour le maïs.....	10
Figure 3 : Répartition de l'ozone atmosphérique (Ressource NASA – Eath Observing System Plan Web).....	12
Figure 4 : Superficie annuelle maximale atteinte pour le trou de la couche d'ozone (ressource Ozone hole watch NASA).....	13
Figure 5 : Répartition de l'ozone en Ile de France (Ressource Airparif - Dossier sur l'ozone).....	16
Figure 6 : Evolution de la concentration en ozone troposphérique depuis 1840 et prévision jusqu'en 2100. Les barres d'erreurs correspondent aux différents scénarios IPCC. D'après Vingarzan (2004). 18	18
Figure 7 : Perte en rendement relative à l'ozone pour les années 2000 (A) et 2030 (B) d'après le scénario A2 du GIEC (Avnery et al. 2011)	23
Figure 8 : Dommages sur la biomasse aérienne du maïs, induits par une surexposition à l'ozone. (Singh et al., 2014)	24
Figure 9 : Induction par l'ozone d'une décroissance rapide de la conductance stomatique (Vahisalu et al., 2010).....	26
Figure 10 : Cycle Halliwell-Asada-Foyer ; Réactions d'oxydo-réduction dans une cellule végétale en réponse à l'ozone (Castagna & Ranieri, 2009).	28
Figure 11 : Regulation de la mort cellulaire, induite par l'ozone, par l'antagonisme réciproque de l'éthylène et l'acide jasmonique (Tuominen et al., 2004).....	31
Figure 12 : Effet de l'âge sur la carbonylation des protéines foliaires, pour les feuilles 1 à 12, avec les feuilles 1 et 12 respectivement les plus âgées et les plus jeunes (Prins et al., 2011).	35
Figure 13 : Mécanismes de clivage des protéines des quatre principales classes de protéases (Van der Hoorn, 2008)	37
Figure 14 : Schéma du dispositif de fumigation à l'ozone.....	44
Figure 15 : Réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (d'après Pourrut et al., 2008).....	53
Figure 16 : A : Fréquence horaire des niveaux d'ozone pour chaque traitement.....	59
Figure 17 : Cumul d'AOT40 au cours de la période de fumigation en fonction du traitement considéré. Les points colorés indiquent les dates de prélèvements. Les mesures des conditions 3,5 m et 2 m ont été effectuées en aval de la source d'ozone, les mesures de la condition contrôle ont été effectuées 15 m en amont de la source d'ozone.	60
Figure 18 : Poids de mille grains mesurés sur des plants de maïs (Zea mays L., cv NK Perform) cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n=10. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n=16. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	61
Figure 19 : Pourcentage d'amidon dans les caryopses récoltés sur des plants de maïs (Zea mays L., cv NK Perform) cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n=10. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n= 16 Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.....	62
Figure 20 : A : Nombre de rang par épi observés sur des épis de plants de maïs (Zea mays L., cv NK Perform) cultivés en atmosphère ambiante ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n=10. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n= 16. B : Nombre de grains par rang. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n=10. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec n= 16. Les	

traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	63
Figure 21 : Teneurs en azote et en carbone dans les tiges des plants de maïs pour la récolte R1(05/09/2011).. (A) : azote (en g.kg ⁻¹), avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA p<0,05). (B) : carbone (en g.kg ⁻¹). (C) : rapport C/N, avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA p<0,05). Les valeurs des différents graphes représentent les moyennes ± ET avec n=5. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	65
Figure 22 : Teneurs en azote et en carbone dans les tiges des plants de maïs pour la récolte R2 (03/10/2011).. (A) : azote (en g.kg ⁻¹), avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA p<0,05). (B) : carbone (en g.kg ⁻¹). (C) : rapport C/N. Les valeurs des différents graphes représentent les moyennes ± ET avec n=5. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	66
Figure 23: Biomasses aériennes fraîche (A) et sèche (B) produites par des plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la biomasse aérienne fraîche représente la moyenne ± ET avec n=64 pour les plants contrôles et les plants à 3,5m, n=63 pour les plants à 2m. Les valeurs pour la biomasse aérienne sèche représentent la moyenne ± ET avec n=48 pour les plants contrôle et les plants 3,5 m, n= 47 pour les plants à 2 m. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	67
Figure 24 : Indices de récolte déterminés sur des plants de maïs cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne ± ET avec n=48 pour les plants contrôles et les plants à 3,5m ; n=47 pour les plants à 2m Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.....	68
Figure 25 : Surface foliaire de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne ± ET avec n=16 (Contrôle, 2 m) et n=15 (3,5 m). Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.....	68
Figure 26 : Surface foliaire de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne ± ET avec n=16 (Contrôle, 2 m) et n=15 (3,5 m). Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.....	69
Figure 27 : Pourcentage de germination de semences récoltées sur des plants de maïs cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent le nombre de semences ayant germé à différents intervalles de temps, avec n=16. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.	70
Figure 28 : A : Assimilation nette (An en $\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les moyennes sont établies sur des périodes de 10 jours (incluant les dates des prélèvements P1-P4), les barres d'erreurs représentent les erreurs standards et n≥6. B : Conductance stomatique (gs en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) du même matériel végétal que A. Les valeurs présentées sont des moyennes de mesures étalées sur 10 jours, les barres d'erreurs représentent les erreurs standards et n≥6. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées, au JJ 243, à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h.....	72
Figure 29 : Teneurs en protéine solubles totales ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MF) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à différentes concentrations d'ozone. Les valeurs représentent les moyennes ± ET, avec n≥3 P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation.....	73

Figure 30 : Teneurs en chlorophylles totales ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à différentes concentrations d'ozone. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ET, avec $n=10$, sauf pour les échantillons du prélèvement P3 à 3,5 m, dont les données sont manquantes. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation.....	74
Figure 31: Activités endoprotéolytiques totales mesurées à différents pH réactionnels dans des extraits protéiques préparés à partir de feuilles de l'épi de plants de maïs exposés à un air enrichi en ozone (2 m) et à l'air ambiant (Contrôle). Les valeurs correspondent aux signaux de fluorescence (en unité arbitraire U.A) faisant suite à la dégradation du substrat BODIPY-Caséine.	75
Figure 32 : Variations des activités endoprotéolytiques totales dans les feuilles de plants de maïs pendant la période de fumigation à l'ozone. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ES avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation.....	76
Figure 33 : Pourcentage d'inhibition (%) des activités endoprotéolytiques totales par des inhibiteurs de deux classes d'endoprotéases. Les extraits protéiques ont été obtenus à partir de feuilles de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone, sur une période de 60 jours. A : Inhibition des protéases à cystéine par le E64. B : Inhibition des protéases à sérine par le Péfabloc. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation	78
Figure 34 : Teneur en ROS (fluorescence UA. G MF^{-1}) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n\geq 3$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation	79
Figure 35 : Teneurs en groupements carbonyle sur les protéines solubles des feuilles de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation	81
Figure 36 : Niveau de peroxydation lipidique dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. exprimée en équivalents MDA (nmol.mL^{-1}). Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation.....	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Quantité moyenne d'eau (en litres), nécessaire à la production d'un kilogramme de matière sèche. (Ressource CNRS – Dossier scientifique sur l'eau : usages-cultures, 2000)	6
Tableau 2 : Récapitulatif des campagnes d'échantillonnages : dates, durées de fumigation, nomenclature et organes prélevés.	46
Tableau 3 : Inhibiteurs de protéases utilisés et classes de protéases inhibées	51

LISTE DES ABREVIATIONS

1-MCP	1-methylcyclopropène
ABA	acide abscissique
ACC	Aminocyclopropane 1-carboxylique
AOT40	Accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb (moyennes horaires cumulées de concentration en ozone au-dessus de 40 ppb)
APX	Ascorbate Peroxydase
AsA	Ascorbate apoplastique
Ca Ci	concentrations : atmosphériques, interne en CO ₂
Canaux anionique de type :	R (rapidly deactivating) - S (slowly deactivating)
CFC	Chlorofluocarbones
COV	Composés organiques volatils
DHA	Déhydroascorbate
ERPURS	Evaluation des Risques de la Pollution URbaine sur la Santé
ET	Ethylène
FACE	Free-Air Carbon dioxide Enrichment (système de fumigation à l'air libre)
GIEC	Groupe d'Experts Intergouvernemental sur le Climat
GR	Glutathion Réductase
g_s	conductances stomatiques
GSH	glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO°	Radical hydroxyle
IR	Rayonnement infrarouge
JA	Acide jasmonique
MCII	métacaspase de type II
MDHA	Monodéhydroascorbate
MDHAR	Monodéhydroascorbate Réductase
NADP-ME	enzyme malique à NADP
NO ₂	Dioxyde d'azote
NOx	Oxydes d'azotes
O ₂ ^{-°}	Ion superoxyde
O ₃	Ozone
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORS Ile-de-France	Observatoire régional de santé Ile-de-France
OTCs	Open Top Chambers (Chambre à ciel ouvert)
PCD	Programmed Cell Death (programme de mort cellulaire)
PEPc	Phosphoénol Pyruvate Carboxylase
ppb	Parties par milliards, en volume
ppm	Parties par millions, en volume
ROS	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)

Rubisco	Ribulos-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
SA	Acide salicylique
SOD	Superoxyde dismutase
SPAR	Soil-Plant-Atmosphere Research
TRX	Thioredoxine
UV	Ultraviolets

I] INTRODUCTION

L'ozone troposphérique, de par son rôle dans le forçage radiatif et son impact sur les organismes, mérite doublement notre attention. De plus, c'est un polluant photochimique secondaire d'origine anthropique dont les concentrations ont dangereusement augmenté depuis le début du XX^{ème} siècle (Vingarzan, 2004). Il apparaît donc essentiel de renforcer les mesures limitant l'augmentation de ses concentrations et d'approfondir nos connaissances sur la manière dont il affecte les plantes. En effet, en plus des risques avérés pour la santé humaine (maladies dégénératives, arthrose, troubles cardiaques, troubles nerveux, cancers) (Kampa and Castanas, 2008) (Kampa and Castanas, 2008) l'impact de l'ozone sur les plantes est connu depuis plusieurs décennies (Haagen-smit, 1952) et toujours pas entièrement compris. Ses effets sur les couverts végétaux perturbent un certain nombre de processus physiologiques et biochimiques essentiels au développement des plantes. Par exemple, l'ozone entraîne l'apparition de lésions foliaires, une baisse de la photosynthèse et une diminution des rendements (Fiscus et al., 2005; Wittig et al., 2007; Feng and Kobayashi, 2009). De plus, dans un contexte climatique changeant son action détrimentale s'ajoute à celles d'autres contraintes environnementales (Ehhalt et al., 2001). Ainsi, pour les espèces végétales cultivées, les conséquences sociétales de l'intensification des effets de l'ozone pourraient être dramatiques (Avnery et al., 2013) à cause de pertes économiques potentielles (Avnery et al., 2011a) dans un contexte mondiale où la sécurité alimentaire est un réel enjeu.

Les connaissances actuelles de l'impact de l'ozone sur les plantes C₄ sont limitées, y compris pour le maïs, qui est pourtant la céréale la plus cultivée au monde. Les lacunes portent tant sur les conséquences que l'ozone peut avoir sur les rendements, que sur celles affectant la physiologie et la biochimie de la plante. Concernant les rendements, la seule relation exposition-réponse proposée dans la littérature (Mills et al., 2007) n'est guère satisfaisante. Toutefois sur la base de celle-ci, Avnery et al. (2011) projettent dans un futur proche des pertes de rendement pour le maïs de l'ordre de 2,5% à 6%, selon les régions du globe. Approfondir nos connaissances dans ce domaine permettrait d'une part de mieux comprendre les

risques pour le maïs et d'autre part de fournir des éléments qui aideront à la prise de décision visant à limiter les conséquences de l'ozone sur cette culture.

L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire de thèse a été supporté par l'Agence Nationale de la Recherche (France) et prend part au projet VULNOZ (ANR-08-VULN-012). La démarche expérimentale mise en place repose sur le suivi des effets d'une exposition chronique à l'ozone de plants de maïs cultivés en champ. Les résultats attendus ont pour ambition d'aider à mieux appréhender les risques que l'ozone représente pour le maïs, en limitant au maximum les biais expérimentaux. Pour ce faire, un dispositif original d'enrichissement de l'air en ozone, utilisant les vents dominants comme agents de dispersion, a été mis en place en champ. De plus, le maïs ayant un fort intérêt agronomique, notre travail s'est placé à différents niveaux d'intégration dans le but de pouvoir répondre à des questions concernant aussi bien la communauté scientifique que les acteurs du monde agricole, afin de les aider dans leur prise de décision.

C'est pourquoi une première partie de notre travail s'est focalisée sur des paramètres agronomiques et a consisté à décortiquer les effets sur le rendement. En plus d'enrichir les connaissances sur les réponses du maïs à l'ozone, les résultats obtenus pourraient permettre de mieux définir la part que cette grande culture pourrait tenir dans les agroécosystèmes futurs. Toutefois, le rendement étant la résultante de nombreux processus intermédiaires, il n'indique qu'une tendance comportementale du maïs en réponse à l'ozone (sensible/tolérant). Une seconde partie de notre étude a donc été consacrée à certains paramètres physiologiques et biochimiques. Nous avons ainsi analysé d'une part, l'évolution des échanges gazeux afin d'évaluer les réponses de la conductance stomatique à l'ozone et les conséquences que pouvait avoir un influx d'ozone sur l'assimilation nette à l'origine de la production de biomasse végétale. D'autre part, nous avons suivi les teneurs en chlorophylles totales et en protéines foliaires solubles tout au long de la période expérimentale afin d'avoir des indicateurs sénescence foliaire, chez les plants de maïs exposés à l'ozone ambiant et aux atmosphères enrichies. Nous nous sommes également intéressés à un certain nombre de paramètres susceptibles de varier en réponse à un stress oxydant, tels que : les teneurs en ROS, la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines foliaires. Enfin, dans l'optique de déterminer dans

quelle mesure les activités endoprotéolytiques foliaires pourraient être de bons indicateurs de contrainte à l'ozone, nous avons mesuré les activités endoprotéolytiques totales régulièrement pendant notre expérimentation et tenté de déterminer la part d'activité spécifique due à deux classes de protéases classiquement répertoriées comme majeures dans les processus de sénescence et de réponses aux contraintes de l'environnement (les protéases à cystéine et sérine).

Ce mémoire de thèse se compose de quatre parties qui font suite à cette introduction. La première partie correspond à une synthèse bibliographique sur les conséquences du changement climatique et de l'ozone sur les plantes, avec un focus sur le maïs lorsque la bibliographie existante le permet. Une deuxième partie présente le matériel végétal étudié et le dispositif expérimental utilisé pour soumettre les plantes à l'ozone, ainsi que les techniques mises en œuvre afin d'étudier les conséquences de l'exposition à l'ozone sur le maïs. La troisième partie présente les résultats obtenus au cours de notre étude. Enfin la dernière partie consiste en une discussion de ces résultats et leurs confrontations avec les connaissances de la littérature actuelle ainsi qu'avec les ambitions initiales de ce projet de thèse, dans le but de proposer de nouvelles perspectives à ce travail.

II] SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II]-1 LE MAÏS

II]-1-1 GENERALITES

Le maïs (*Zea mays* L.), avec le sorgho et la canne à sucre, fait partie des plantes dites en C_4 à fort intérêt économique. Il occupe une place essentielle dans l'alimentation humaine et animale et trouve ses origines, il y a de 7000 à 10 000 ans, au Mexique avec la téosinte. Aujourd'hui, on le retrouve cultivé à travers le monde (Source USDA) et il représente 41% de la production mondiale de céréales (d'après l'Association Générale des Producteur de Maïs). Les usages qui en sont faits varient avec les zones de culture. Dans les pays les plus pauvres, son usage premier concerne l'alimentation humaine alors que dans les pays industrialisés, il doit principalement son succès à son importance dans l'alimentation animale. Aux Etats-Unis par exemple, c'est 80% de la production de maïs qui sont destinés au bétail (Ahmad, 2012) et à de multiples autres usages annexes. Ainsi, il peut être valorisé au travers de ses feuilles, de ses rafles ou de ses grains, comme matière première pour la fabrication d'un certain nombre de produits tels que des édulcorants, de l'huile, des boissons, de la colle, de l'alcool et surtout des agrocarburants ; cette dernière application concerne environ 40 % de la production de maïs aux Etats-Unis (Ranum et al., 2014)

Classiquement, la phénologie du maïs comprend deux grandes phases, la phase végétative et la phase reproductive ([Fig.1](#)). Chacune de ces phases peut elle-même être subdivisée en périodes plus courtes que l'on caractérise par le nombre de feuilles pleinement développées. On note généralement V_n et R_n ces sous-phases (n correspondant au nombre de feuilles). Toutefois, pour l'émergence du coléoptile, on parle de V_E et la fin de la phase végétative est notée V_T , qui correspond au stade où l'inflorescence mâle ou panicule est parfaitement développée.

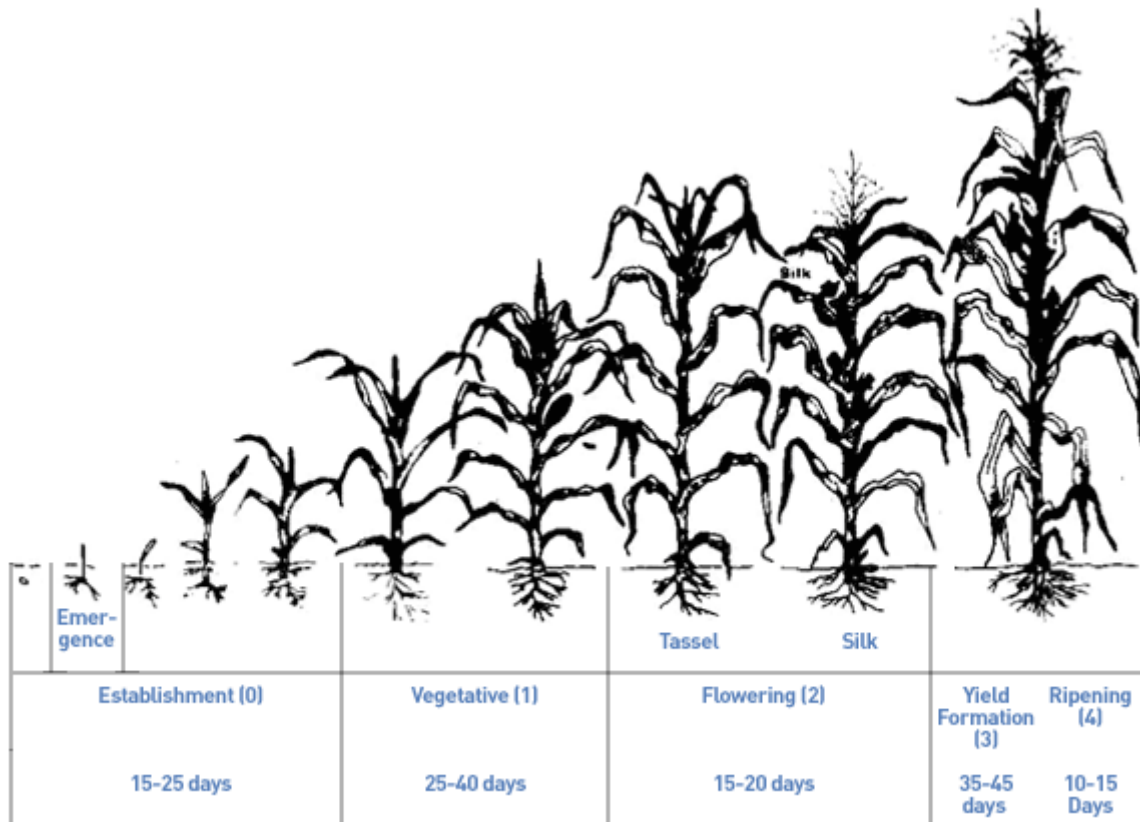


Figure 1: Stades de développement du maïs (ressource FAO WATER)

II]-1-2 EXIGENCES CLIMATIQUES

Le maïs est une plante d'origine tropicale avec des exigences climatiques bien définies. D'après la FAO (2015), il supporte difficilement les températures inférieures à 10°C qui compromettent la germination. Cependant, un certain nombre de cultivars existants à ce jour s'accommodent des climats tempérés, pendant les périodes exemptes de gel et quand les températures journalières dépassent 15°C. Il reste toutefois préférable de le cultiver dans des environnements où les températures journalières dépassent 20°C afin d'éviter les problèmes associés à la maturation des grains. Par ailleurs, si les températures sont optimales, la durée d'un cycle de culture pour le maïs à grains est courte : de 80 jours pour les variétés les plus précoces à 140 jours pour les plus tardives. Les relations qui unissent un cultivar donné à la température sont bien documentées et il est possible d'anticiper le développement de la plante en faisant la somme des degrés jours (Bonhomme, 2000). Le maïs tolère bien les températures élevées (jusqu'à 45°C) et les atmosphères sèches à condition d'être correctement alimenté en eau, en particulier durant la floraison et la période de

pollinisation. En effet, ces deux processus sont particulièrement sensibles aux déficits hydriques édaphiques qui peuvent se développer rapidement du fait de la superficialité du système racinaire. L'efficacité de l'eau du maïs est toutefois assez élevée en comparaison de celle d'autres grandes cultures comme l'orge, le blé, le soja, la pomme de terre, le riz pluvial, ou le coton ([Tableau 1](#)). Cette particularité, combinée à une grande surface foliaire et à une fixation du carbone de type C₄, fait du maïs la céréale présentant le potentiel de rendement en grain le plus élevé.

Tableau 1 : Quantité moyenne d'eau (en litres), nécessaire à la production d'un kilogramme de matière sèche. (Ressource CNRS – Dossier scientifique sur l'eau : usages-cultures, 2000)

Maïs ensilage	238
Banane	346
Maïs grain	454
Orge	524
Pomme de terre	590
Blé	
Soja	900
Riz pluvial	1600
Riz inondé	5000
coton	5263

II]-2 PLANTES ET CHANGEMENT CLIMATIQUE

Le Groupe d'Experts Intergouvernemental sur le Climat (GIEC) a mis en évidence la responsabilité des émissions de gaz à effet de serre d'origines anthropiques, dans l'augmentation globale des températures et du changement rapide des conditions climatiques actuelles et de celles prévues pour le siècle à venir (IPCC, 2013). Or, le développement, la physiologie et la biochimie des plantes sont directement impactés par ces changements, en particulier par l'augmentation des concentrations de CO₂ et des températures et par la baisse de la disponibilité en eau (Vörösmarty et al., 2010). Dans un contexte de croissance démographique record associé à une exigence grandissante concernant la qualité et la quantité des ressources alimentaires, il est primordial d'anticiper la façon dont ces perturbations

environnementales peuvent impacter les grandes cultures, parmi lesquelles le maïs occupe une place prépondérante. C'est pourquoi afin de mieux appréhender l'intérêt potentiel du maïs dans ce contexte environnemental incertain, nous proposons une revue succincte des principaux effets du changement climatique sur les plantes de grandes cultures.

II]-2-1 PLANTES ET CO₂

Depuis 1750, l'activité humaine est responsable d'une importante augmentation des concentrations atmosphériques en CO₂ qui sont passées de 270 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (ppb) avant l'ère industrielle, à 394 $\mu\text{L.L}^{-1}$ en 2013. Les prévisions actuelles tablent sur une accélération de l'élévation de ces concentrations, qui devraient atteindre 550 $\mu\text{L.L}^{-1}$ à la moitié du siècle et 800 $\mu\text{L.L}^{-1}$ à la fin du siècle (Jin et al., 2015)

Si dans certains cas ces concentrations élevées en CO₂ inhibent l'assimilation des nitrates (Ghannoum, 2009), il semble plus probable qu'elles puissent améliorer les capacités photosynthétiques des plantes, agissant alors comme un « fertilisant » (Kimball et al., 2002) Pour expliquer ce phénomène, il faut s'intéresser aux mécanismes de fixation du carbone. Chez les plantes en C₃, les augmentations de la photosynthèse nette, de la biomasse et plus généralement des rendements en réponse à des concentrations atmosphériques en CO₂ élevées découlent de deux propriétés de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco), carboxylase responsable de la fixation du CO₂. D'une part, l'enzyme n'est pas saturée par les concentrations atmosphériques actuelles en CO₂ (C_a). Une augmentation de ces dernières a donc pour conséquence directe, une augmentation de la vitesse de carboxylation dont découle une augmentation de la photosynthèse nette et de la synthèse de matière organique. D'autre part, le CO₂ est un inhibiteur compétitif de la réaction d'oxygénation de la Rubisco. Une augmentation de sa concentration limite donc la photorespiration et par là même les pertes nettes en matière organique qui en découlent (Long et al., 2005). Ainsi, Kimball (1983), prévoyait qu'une augmentation des concentrations en CO₂ jusqu'à 550 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ aurait pour conséquence une augmentation de 25 % des rendements chez les C₃. Cependant, à ce jour, aucune des augmentations de rendement observées lors

d'expérimentations en chambre à ciel ouvert (*Open Top Chambers, OTCs*) n'atteignent une telle valeur.

Chez les plantes en C_4 , les concentrations en CO_2 dans la gaine périvasculaire sont largement supérieures aux concentrations atmosphériques, saturant la Rubisco et limitant également la compétition avec les réactions d'oxygénation. Ainsi, la photosynthèse de ces espèces végétales est rapportée comme généralement insensible aux augmentations de teneurs en CO_2 atmosphérique (Ruiz-Vera et al., 2015).

Cependant, Kim et al. (2007), ont observé, sur des maïs cultivés en chambre de type *Soil-Plant-Atmosphere Research (SPAR)*, des baisses de l'efficacité de la carboxylation en réponse à un enrichissement de l'air en CO_2 . Les chercheurs expliquent ces baisses par une « acclimatation » du cycle C_4 , correspondant à une diminution de l'activité de la Phosphoénol Pyruvate Carboxylase (PEPc) et de l'enzyme malique à NADP (NADP-ME), en réponse à l'enrichissement de l'air en CO_2 . A l'inverse, certains modèles étudiant l'impact sur le rendement des plantes en C_4 et sur celui du maïs en particulier prévoient dans le cas d'élévations du CO_2 à $550 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, des augmentations allant jusqu'à 10 % (Long et al., 2005). Comme pour les C_3 , ces prévisions n'ont pas été vérifiées en conditions expérimentales d'enrichissement d'air libre en CO_2 (Free-Air Carbon dioxyde Enrichment, *FACE*) (Leakey et al., 2004; Leakey et al., 2006; Markelz et al., 2011), qui n'ont montré aucune augmentation significative de rendement, malgré des conditions optimales de culture (Long et al., 2005). L'étude la plus récente menée en *FACE* par Ruiz-Vera et al. (2015), conclut elle aussi à une absence d'effet d'une atmosphère enrichie en CO_2 (les concentrations de CO_2 ambiant étaient d'environ $390 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, contre environ $585 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ pour les concentrations élevées de CO_2), sur le maïs, que ce soit sur la photosynthèse, les biomasses souterraines et aériennes ou le rendement. De plus, cette étude, en adéquation avec les études en *FACE* antérieures (Leakey et al., 2006; Markelz et al., 2011), met en évidence chez les plants de maïs cultivés en atmosphère enrichie en CO_2 des conductances stomatiques (g_s) plus faibles (réduction de l'ordre de 33%), ce qui semble indiquer que le seul effet positif que pourrait avoir une augmentation des concentrations atmosphériques en CO_2 passerait par une diminution de l'évapotranspiration.

II]-2-2 PLANTES ET TEMPERATURE

Les plantes C_4 sont sensibles aux variations de températures et de plus présentent le plus souvent, des températures optimales de croissance bien supérieures à celles des plantes C_3 (Sage and Kubien, 2007). D'après Kim et al. (2007), la photosynthèse foliaire répond à l'augmentation de température selon une courbe gaussienne, avec un optimum à 34°C ; Ben-Asher et al. (2008), ont obtenu des résultats similaires mais avec un maximum photosynthétique à 32°C ([Fig.2](#)). Sur cette base, une augmentation des températures actuelles pourrait avoir un effet positif sur l'assimilation du carbone chez le maïs. Cependant, ces augmentations de la photosynthèse ne se traduisent pas nécessairement par des augmentations de rendement. En effet, l'augmentation de la température et par conséquent celle de la somme des degrés jours peut raccourcir le cycle de vie du maïs en limitant la durée des phases de reproduction et de remplissage des grains (Badu-Apraku et al., 1983; Muchow, 1989). De plus, les sensibilités du pollen et de l'albumen (pendant la phase de division cellulaire) aux températures supérieures à 35°C, et la faible activité de réplication des amyloplastes au-delà de 30°C (Hatfield et al., 2011) suggèrent également que des élévations de température, tout en stimulant la photosynthèse, n'entraîneront pas nécessairement des gains de rendement. Enfin, la croissance foliaire est elle aussi affectée négativement par les hausses de températures. Kim et al. (2007) ont mis en évidence que les surfaces foliaires maximales obtenues pour des températures de 19/13°C (jour/nuit) ne sont pas atteintes pour des températures de 31/25°C et 38,5/32,5°C (jours/nuit), même si la surface des feuilles s'accroît plus précocement. En tenant compte de tous ces éléments d'information, Schlenker and Roberts (2009), proposent finalement pour le maïs, le seuil de 29°C au-delà duquel des pertes de rendement seraient observées, malgré l'écart avec l'optimum photosynthétique de 32-34°C.

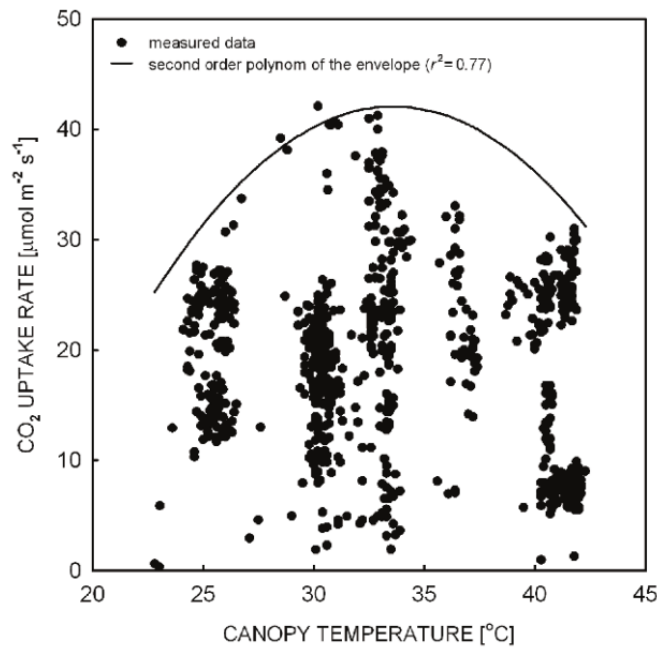


Figure 2: Relation entre la photosynthèse nette et la température de la canopée pour le maïs (Ben-Asher, 2008))

II]-2-3 PLANTES ET SECHERESSE

Malgré l'importance des plantes C_4 dans le cycle global du carbone et pour la sécurité alimentaire, les modifications de leurs capacités photosynthétiques en réponse au déficit hydrique ont fait l'objet de peu d'études en comparaison de celles menées sur les plantes C_3 .

La disponibilité en eau est sans aucun doute déjà une préoccupation majeure pour la plupart des acteurs de l'agriculture à travers le monde. Les plantes C_4 sont réputées pour être plus tolérantes aux contraintes hydriques que les C_3 . Cependant toutes les C_4 ne réagissent pas de la même manière. Le sorgho par exemple, est connu pour être plus résistant à la sécheresse que le maïs, ce qui serait dû à son réseau racinaire dense et s'enfonçant profondément dans le sol (Farré and Faci, 2006). Le maïs quant à lui est particulièrement sensible aux déficits hydriques pendant la floraison (Çakir, 2004) et dans une moindre mesure, pendant la phase végétative de part l'importance de la surface et de la vitesse de croissance de ses feuilles qui favoriserait l'évapotranspiration (Kakani et al., 2011). Le maïs connaît également, lors des périodes de sécheresse, une inhibition de la photosynthèse

généralement attribuée à une fermeture stomatique (Foyer et al., 1998). L'effet de la fermeture stomatique sur l'assimilation du CO_2 n'est pas immédiat car les plantes C_4 saturent leur Rubisco en CO_2 , même à de faibles concentrations en CO_2 intercellulaire. De plus, les faibles quantités de CO_2 résultant de la photorespiration, généralement peu intense chez les C_4 , sont susceptibles d'être fixées avant de diffuser hors de la gaine périvasculaire. Ces particularités structurales et fonctionnelles propres aux C_4 limitent les baisses de photosynthèse pendant une sécheresse mais assurent aussi une reprise rapide de la photosynthèse dès la fin de la contrainte hydrique (Foyer et al., 1998).

Les propriétés culturales du maïs, comme sa capacité à se développer sous des températures élevées, son mode de fixation du carbone en C_4 et l'efficacité de l'eau qui en découle, le définissent comme une culture potentiellement tolérante au changement climatique amorcé par l'intensification des activités anthropiques. De plus, ces activités sont également responsables de l'augmentation des concentrations en ozone troposphérique (O_3) qui représente aujourd'hui et pour les années à venir une menace pour les écosystèmes. Il est donc important de s'interroger sur les impacts connus et/ou prévus de ce polluant phytotoxique sur le rendement du maïs, ce qui sera fait après une brève description des origines de l'ozone anthropique et de l'évolution des concentrations.

II]-3 L'OZONE ATMOSPHERIQUE

L'ozone est une molécule, formée de trois atomes d'oxygène, au fort pouvoir oxydant. Sa facilité à réagir avec les autres composés de l'atmosphère terrestre fait qu'on ne le trouve, le plus souvent, qu'à l'état de trace de 0 à 0,07 ppm selon l'altitude. En effet, l'ozone connaît une répartition verticale hétérogène et selon les couches de l'atmosphère ([Fig.3](#)), il impacte différemment le vivant. En effet de part son fort pouvoir oxydant (potentiel d'oxydation de 2,076 V), l'ozone peut réagir avec de nombreux composés biologiques et perturber le fonctionnement des organismes qui y sont exposés ; cependant ses propriétés d'absorption de la lumière ont un impact considérable sur la chimie de l'atmosphère. D'une part il préserve la surface terrestre des rayonnements ultraviolets (UV) et d'autre part il participe au forçage radiatif en absorbant le rayonnement infrarouge (IR).

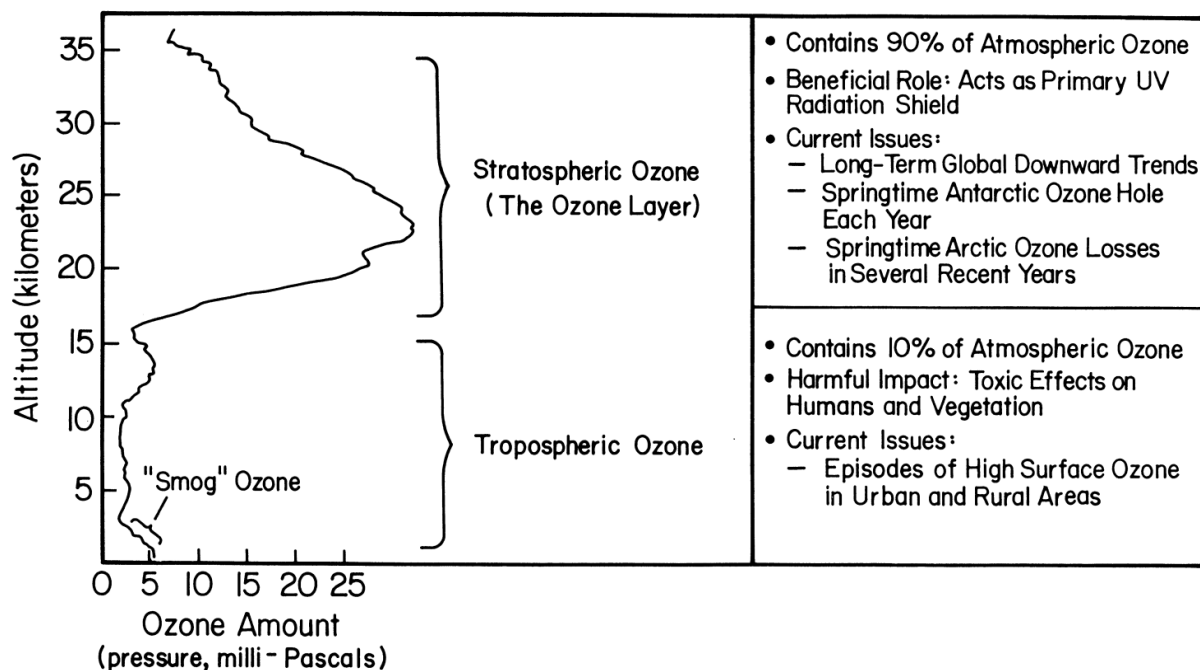


Figure 3 : Répartition de l'ozone atmosphérique (Ressource NASA – Eath Observing System Plan Web)

II]-3-1 L'OZONE STRATOSPHERIQUE

Dans la stratosphère (entre 12 et 50 km d'altitude en moyenne), l'ozone est le produit réactionnel de la rencontre d'une molécule de dioxygène et d'un atome d'oxygène, lui-même issu de la photodissociation d'une molécule de dioxygène sous l'effet de rayonnements UV ; de plus l'ozone peut être à son tour décomposé en dioxygène par les rayonnements UV ce qui contribue à maintenir un équilibre dynamique entre sa formation et sa dégradation. L'ozone stratosphérique représente la majorité de l'ozone atmosphérique, près de 90 %, et forme ce qu'on appelle couramment la couche d'ozone. Il est couramment admis que cette dernière a été indispensable à l'évolution de la vie à la surface de la Terre et aujourd'hui elle est indispensable à son maintien. En effet comme dit précédemment, l'ozone préserve le vivant des effets nocifs des rayonnements solaires UV, en particulier ceux de courtes longueurs d'ondes (de hautes énergies), comprises entre 100 et 280nm (Lodyga et al., 2015). Toutefois depuis la fin des années 70, on constate une diminution de l'ozone stratosphérique, en particulier au niveau des pôles, où l'on parle de trou dans la couche d'ozone ([Fig.4](#)). Cette diminution est en grande partie due à la pollution par

les halogénoalcanes, les oxydes d'azotes (NO_x) et les chlorofluocarbones (CFC), qui sous l'action des rayonnements UV se photodissocient et réagissent avec les molécules d'ozone. Ces composés réduisent ainsi directement les teneurs en ozone stratosphérique, mais également indirectement en absorbant une partie du rayonnement UV, ce qui limite d'autant la photodissociation du dioxygène et donc la régénération de l'ozone. Bien que des mesures aient été prises avec succès pour réduire les émissions de CFC (Protocole de Montréal et de Kyoto, 1987 et 1997), la grande stabilité de ces polluants fait qu'ils persistent plusieurs décennies dans l'atmosphère.

La réduction de la couche d'ozone a de lourdes conséquences sur les écosystèmes et les agrosystèmes. En effet, les UV filtrés moins efficacement et l'altération du forçage radiatif due à l'ozone peut avoir de lourdes conséquences sur la chimie de l'atmosphère. Certaines de ces conséquences sont directes et concernent la santé des systèmes biologiques ; toutefois ces variations impactent le bilan énergétique de la Terre et il est difficile d'en prévoir toutes les conséquences indirectes. Il a par exemple été établi que la diminution de la couche d'ozone affectait les « patterns » des précipitations, les courants océaniques et aériens, ainsi que la fonte des glaces, ce qui pourrait se traduire à la fois par des sécheresses sévères dans certaines régions et des inondations dans d'autres (World Meteorological Organization (WMO), 2014).

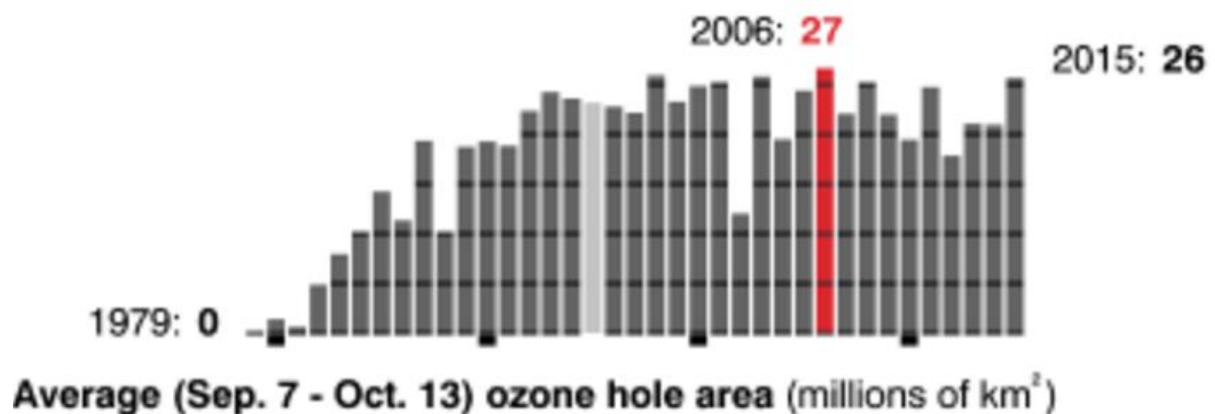


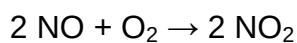
Figure 4 : Superficie annuelle maximale atteinte pour le trou de la couche d'ozone (ressource Ozone hole watch NASA)

II]-3-2 L'OZONE TROPOSPHERIQUE

II]-3-2-1 FORMATION

La troposphère qui s'étend de 8 à 16 km, selon que l'on se situe aux pôles ou à l'équateur, rassemble l'essentiel de la masse d'air de l'atmosphère mais seulement 10 % de l'ozone total qui constitue, à ce niveau un polluant. Bien qu'il existe entre la stratosphère et la troposphère des échanges d'ozone au niveau de la tropopause (via les *jet stream*), l'essentiel de l'ozone troposphérique est issu de synthèses locales par photochimie (Grewe, 2005). La faiblesse du rayonnement UV au niveau de la troposphère limitent les réactions de formation similaires à celles qui surviennent dans la stratosphère ; de plus l'ozone produit de cette façon reforme rapidement du dioxygène (Bagard, 2008). La synthèse de l'ozone dans la troposphère résulte donc principalement d'interactions entre les rayonnements UV et des gaz issus d'activités anthropiques et/ou des composés organiques volatils (COV) issus soient d'activités anthropiques soient des couverts végétaux. L'O₃ est donc qualifié de polluant photochimique secondaire.

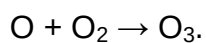
Certaines activités industrielles et la circulation routière entraînent d'importantes libérations d'oxydes d'azotes (NO_x) dans la troposphère. Parmi ceux-ci, le monoxyde d'azote (NO) réagit avec le dioxygène ambiant et forme du dioxyde d'azote (NO₂) :



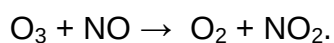
Ce dernier, sous l'effet du rayonnement UV de basses énergies, se photodissocie en

$$\text{NO}_2 + h\nu \rightarrow \text{NO} + \text{O}$$

L'atome d'oxygène libéré réagit avec une molécule de dioxygène pour former de l'O₃ :



En absence de COV, l'ozone formé peut réagir de nouveau avec le NO, ce qui limite son accumulation dans la troposphère :

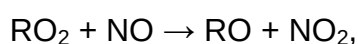


Toutefois certains COVs court-circuitent le cycle de formation-destruction de l'ozone.

Ceux-ci réagissent en effet avec le dioxygène selon la réaction:



ces produits de réaction réagissent à leur tour avec le monoxyde d'azote :



entrant ainsi en compétition avec l'O₃, ce qui entraîne l'accumulation de ce dernier

dans la troposphère (Jenkin and Clemitshaw, 2002).

III]-3-2-2 REPARTITION DE L'OZONE TROPOSPHERIQUE

De part les conditions de formation et d'accumulation de l'ozone, les concentrations en ozone troposphérique présentent une hétérogénéité spatiale : zones urbaines / zones rurales, et temporelle : journalière et saisonnière (Domínguez-López et al., 2014). A l'origine de ces variations, une relation positive entre rayonnement solaire et synthèse d'O₃ et une relation négative entre teneurs troposphériques en O₃ et NO_x. La synthèse de l'O₃ a en effet lieu le jour, la nuit, l'absence de rayonnement UV ne la permet pas et l'O₃ accumulé est éliminé par réaction avec le NO. Les différences d'intensités lumineuses entre les périodes d'automne-hiver et printemps-été expliquent de la même façon les variations saisonnières de concentrations en O₃ troposphérique. En zone urbaine, les émissions de NO_x dues aux activités humaines sont élevées. Par exemple, le trafic routier matinal libère une importante quantité de monoxyde d'azote qui permet l'élimination de l'O₃, alors que les températures plutôt basses ne permettent pas l'émission de COV par les plantes, leurs présences se limitant à ceux d'origines anthropiques. Les villes connaissent donc des concentrations en ozone maximales lorsque les températures et l'ensoleillement sont élevés. Les pics d'ozone urbain se rencontrent l'été, lors des périodes de fortes chaleurs durant lesquels la faiblesse des vents favorise sa stagnation. Dans les zones périurbaines et rurales, le NO est présent à des concentrations trop faibles pour éliminer totalement l'O₃ synthétisé. De plus, ces zones se caractérisent par une grande proportion de couverts végétaux, sources importantes de COVs, auxquels viennent s'ajouter ceux d'origines industrielles transportés par les vents depuis les centres urbanisés. Ceci entraîne leur accumulation au-dessus des couverts végétaux, augmentant le risque d'exposition des grandes cultures à l'ozone ([Fig.5](#)).

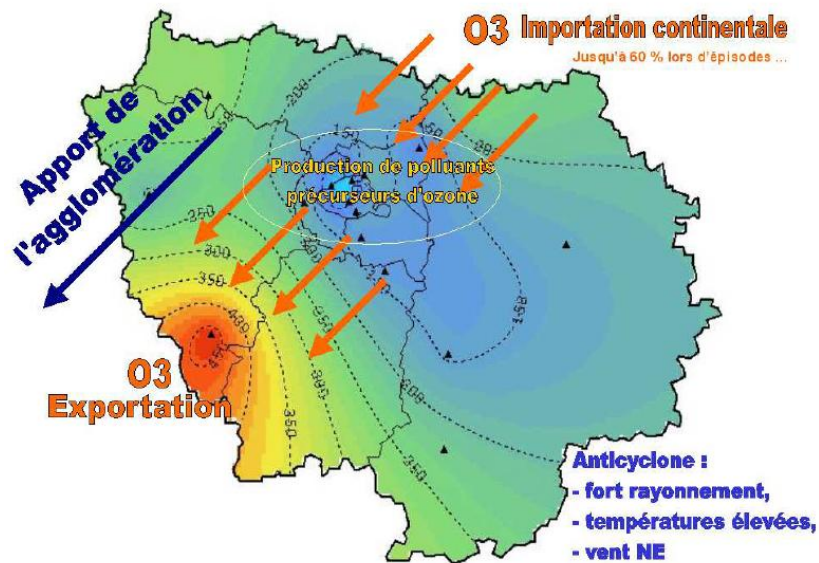


Figure 5 : Répartition de l'ozone en Ile de France (Ressource Airparif - Dossier sur l'ozone)

III]-3-2-3 EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN OZONE

TROPOSPHERIQUE

Dans l'hémisphère Nord, la teneur basale moyenne en ozone troposphérique est passée de 10-15 ppb au début du XXème à environ 35 ppb de nos jours (Vingarzan, 2004; Fuhrer, 2009). La cause principale d'une telle augmentation est le développement considérable des activités industrielles humaines depuis l'ère préindustrielle, qui s'est traduit par une augmentation des émissions des précurseurs de l'ozone (NO_x et COVs). Le niveau basal d'ozone troposphérique continue d'ailleurs d'augmenter, à hauteur de 0,3 ppb par an (Wilkinson et al., 2012). Cette augmentation des niveaux d'ozone se voit également accompagnée de pics de pollution. En Ile-de-France par exemple, les concentrations les plus élevées se retrouvent dans le sud-ouest de la région et peuvent atteindre les 150 ppb (ressource Airparif).

L'augmentation de l'activité anthropique s'accompagne également de changements climatiques. Si rien n'est fait, ces derniers, devraient d'ici 2050 (IPCC, 2013), favoriser l'augmentation des concentrations moyennes d'O₃, durant les

périodes sensibles, au niveau des régions polluées et diminuer les concentrations moyennes d'O₃ au-dessus des océans tropicaux. Des mesures efficaces ont toutefois été prises avec la signature du protocole de Montréal en 1987 par les pays occidentaux (Amérique du Nord et Europe de l'Ouest) afin de réduire les émissions de CFC (Solberg et al., 2005). En se basant sur des modélisations et en considérant que les pays signataires respectent leurs engagements, d'ici 2050, les concentrations moyennes d'O₃ devraient alors avoir diminué durant les périodes les plus sensibles et ce malgré le changement climatique. Cependant, dans les régions où les législations sont moins contraignantes, les émissions de précurseurs de l'ozone devraient continuer d'augmenter : ainsi en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique, on s'attend à des augmentations des niveaux d'ozone ambiant et des fréquences des épisodes de pollutions (The Royal Society, 2008). En se basant sur les évolutions prévisionnelles des teneurs en ozone dans les basses couches de l'atmosphère (d'après les scénarios du GIEC), à l'échelle mondiale, les teneurs basales en O₃ devraient donc continuer d'augmenter jusqu'à atteindre des concentrations de 35-48 ppb en 2040 et de 42-84 ppb en 2100 ([Fig.6](#) ; (Vingarzan, 2004)).

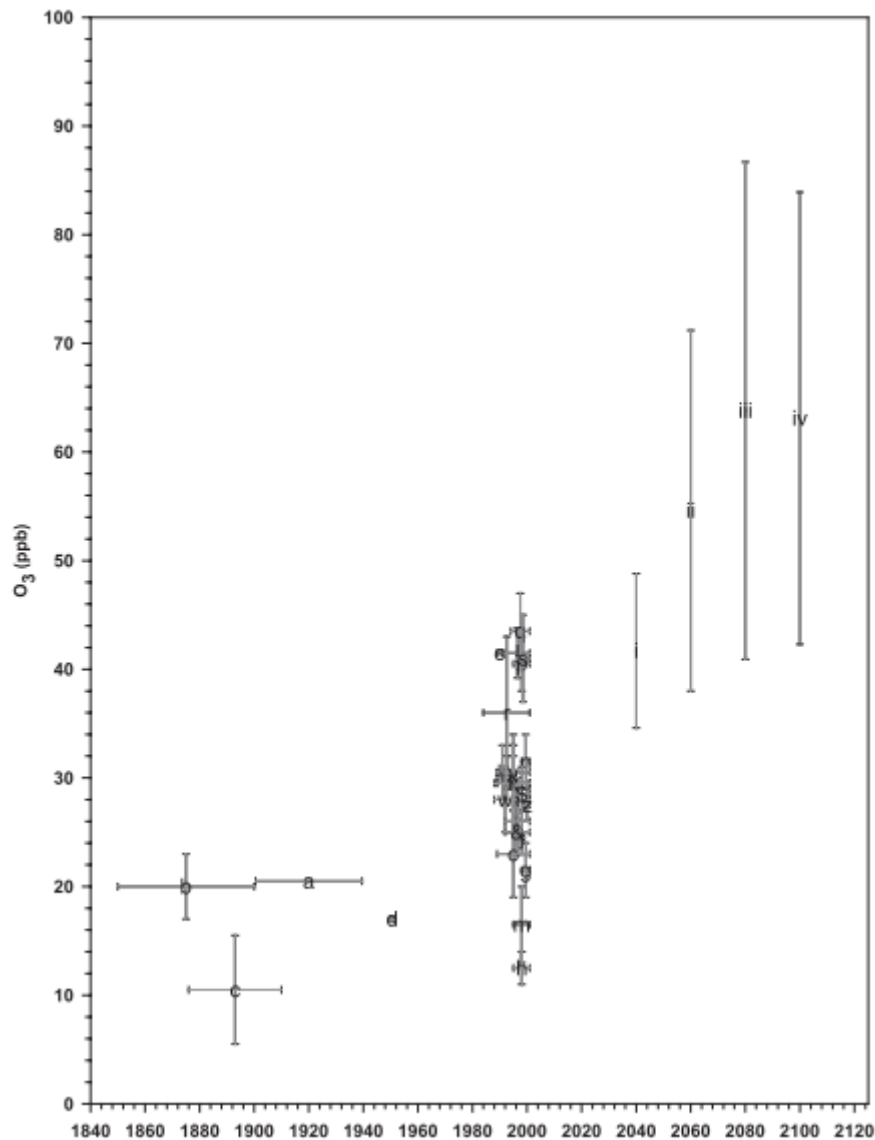


Figure 6 : Evolution de la concentration en ozone troposphérique depuis 1840 et prévision jusqu'en 2100. Les barres d'erreurs correspondent aux différents scénarios IPCC. D'après Vingarzan (2004).

II]-4 IMPACT DE L'OZONE TROPOSPHERIQUE SUR LA SANTE HUMAINE

L'ozone est un gaz irritant oxydant capable de pénétrer le système respiratoire. Ses effets connus sur la santé humaine dépendent à la fois des concentrations dans l'atmosphère, des quantités inhalées et de la durée d'exposition. Cependant, il est difficile d'anticiper toutes les conséquences que pourrait avoir l'ozone sur notre organisme. En effet, comme celui de l'ensemble des eucaryotes, notre métabolisme génère en continu des radicaux libres, dans un contexte « normal » et cette

production peut être exacerbée par le contact avec des polluants tels que l'ozone. Le problème étant que, si les concentrations en radicaux dépassent un certain seuil, l'organisme entre dans un état de stress oxydant qui peut être à l'origine d'un large panel de maladies dégénératives, d'arthrose, de troubles cardiaques, de troubles nerveux, de cancers... (Kampa and Castanas, 2008). Le programme d'Evaluation des Risques de la Pollution URbaine sur la Santé (ERPURS), initié en 1990 et mis en place par l'Observatoire régional de santé Ile-de-France (ORS Ile-de-France), a mis en évidence une augmentation de 6,1% de la mortalité liée à des problèmes respiratoires et cardiovasculaires pendant les périodes de forte pollution à l'ozone. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a récemment réévalué les risques que peut représenter une exposition à l'ozone pour la santé humaine (World Health Organization, 2013). Si les synthèses précédentes mettaient l'accent sur l'impact des pics de pollutions, cette dernière revue relève la difficulté à déterminer des seuils en deçà desquels l'ozone ne serait pas dangereux et suggère plutôt que les concentrations ambiantes d'ozone représentent une menace permanente pour la santé.

En France, les effets de l'ozone sur la santé ont poussé les autorités à mettre en place des niveaux d'alerte reposant sur les concentrations en ozone troposphérique. Le premier niveau correspond à un seuil d'information et de recommandation, il est atteint lorsque les moyennes horaires des concentrations en ozone ambiant dépassent $180 \mu\text{g.m}^{-3}$ (environ 90 ppb). Les niveaux d'alerte plus élevés sont définis par trois seuils :

- Le 1^{er} seuil est atteint lorsque les moyennes horaires dépassent $240 \mu\text{g.m}^{-3}$ (environ 120 ppb).
- Le 2^{ème} seuil est atteint lorsque les moyennes horaires dépassent $300 \mu\text{g.m}^{-3}$ (environ 150 ppb) pendant 3 heures consécutives.
- Le 3^{ème} seuil est atteint lorsque les moyennes horaires dépassent les $360 \mu\text{g.m}^{-3}$ (environ 180 ppb).

II]-5 IMPACT DE L'OZONE TROPOSPHERIQUE SUR LES COUVERTS VEGETAUX

(Haagen-smit, 1952) sont les premiers à mettre en évidence l'effet nocif de

l'ozone sur les plantes. Depuis la publication de leurs travaux, la phytotoxicité de l'ozone a fait l'objet de nombreuses études. Il est aujourd'hui considéré comme le premier polluant mondial pour les plantes. Bien qu'à l'échelle des temps géologiques, l'O₃ reste une contrainte très récente, les recherches menées sur ses effets ont tout de même permis de mettre en évidence une variabilité dans la sensibilité à l'ozone, au sein d'un petit groupe d'espèces végétales considérées : les plantes qualifiées de sensibles (blé, tomate, soja...), les plantes modérément tolérantes (parmi lesquelles le maïs a été placé) et les plantes résistantes (orge, fraisier...) (Mills et al., 2007). Comme c'est le cas pour toute contrainte environnementale, la réponse des plantes dépend de leur sensibilité intrinsèque mais également des modalités de la contrainte subie. Lorsque celle-ci correspond à des concentrations élevées pendant un laps de temps court, on parle alors d'une exposition aiguë. On parle d'exposition chronique lorsque l'exposition est régulière et correspond à des doses d'ozone plus ou moins élevées. Dans les deux situations, les rendements des cultures considérées sont limités. Des expositions chroniques entraînent souvent une réduction de la photosynthèse et une accélération de la sénescence alors que des expositions aiguës conduisent à des réponses des plantes s'apparentant à des réponses d'hypersensibilité incluant des lésions foliaires par mort cellulaire programmée, telles que celles causées par des agents pathogènes (Castagna and Ranieri, 2009).

La sélection variétale et les techniques culturales visant à optimiser les rendements amplifient involontairement l'effet délétère de l'ozone sur les grandes cultures, car pour favoriser l'assimilation du carbone par les plantes, des conductances stomatiques élevées sont recherchées. Or ces dernières augmentent le flux entrant d'ozone dans les tissus foliaires. De plus, les périodes de croissance des principales grandes cultures céréalières coïncident avec les périodes où les teneurs en ozone troposphérique sont maximales (Cf [Répartition de l'ozone troposphérique](#)). Par exemple, en Ile-de-France, durant la période estivale et lorsque les conditions climatiques sont favorables à son accumulation, il n'est pas rare de dépasser les 90 ppb d'ozone et plus ponctuellement d'atteindre les 150-180 ppb (Source Airparif). Les plantes cumulent donc les effets d'une exposition chronique avec ceux consécutifs des pics d'ozone, ce qui peut doublement affecter la physiologie de la plantes et à terme son rendement.

II]-5-1 PHENOLOGIE ET SENSIBILITE A L'OZONE

La phénologie des plantes joue un rôle dans leur sensibilité aux contraintes de l'environnement. Ainsi, il est admis que la période de reproduction et plus spécifiquement celle de la floraison sont les périodes les plus critiques dans le cycle de vie d'une plante (Black et al., 2000). Ceci serait d'autant plus vrai dans le cas des céréales dont les rendements dépendent directement de la fécondation. Pleijel et al. (1998) ont observé qu'une surexposition à l'ozone durant la période s'étalant de l'anthèse à la fin du remplissage des grains avait pour conséquence une baisse des rendements en grain significative chez le blé tendre. Des perturbations de la germination des pollens et de la croissance du tube pollinique, de la floraison et de la fécondation ont ainsi été rapportées (Black et al., 2000). Une exposition à l'ozone durant la phase végétative peut également avoir un impact négatif sur le rendement du blé tendre. Le polluant, en limitant la fixation du carbone durant cette période, compromettrait le remplissage des grains par translocation de carbone (Mulholland et al., 1997-1998). Dans leur méta-analyse, Black et al. (2000) confirment l'impact potentiel de l'ozone tout au long du cycle de développement des plantes et chiffrent les pertes de rendement chez de nombreuses espèces cultivées. Toutefois, certaines espèces, comme *Brassica napus* et *B. campestris* présentent des rendements en grains non impactés par une exposition à l'ozone, alors que les tissus végétatifs ne sont pas épargnés. Cela suggère l'existence de mécanismes de compensation entre tissus végétatifs et reproducteurs, en faveur de l'investissement reproducteur (Black et al., 2007)

II]-5-2 IMPACT DE L'OZONE TROPOSPHERIQUE SUR LE MAÏS

Le maïs est la céréale la plus cultivée au monde, devant le blé (Source USDA). Les pertes potentielles de rendement chez le maïs, en réponse aux concentrations croissantes d'ozone représentent donc de possibles menaces pour la sécurité alimentaire dans le monde. Bien qu'il soit primordial d'évaluer l'impact que l'ozone pourrait avoir sur cette culture, les études traitant de ce sujet sont rares. (Leitao et al., 2007a-b) sont les premiers à étudier l'impact de l'ozone troposphérique sur des plants de maïs cultivés en chambre à ciel ouvert (*Open Top Chambers*, *OTCs*), d'un point de vue physiologique et biochimique. Leurs résultats montrent que

les activités Rubisco et PEPc diminuent en réponse à l'ozone tout comme la production de biomasse aérienne. Bien que la rareté des études traitant de l'effet de l'ozone sur le rendement du maïs soit un frein à leur compréhension, il existe une fonction exposition-réponse pour l'ozone (en AOT40) et le rendement du maïs (voir ci-dessous) (Mills et al., 2007).

$$Y = -0.0036x + 1.02 \quad (r^2 = 0.35)$$

D'après cette relation, une exposition à un AOT40 de 13,9 ppm.h (niveau critique) pendant trois mois, entraîne des pertes de rendement de 5%, ce qui classe le maïs parmi les espèces modérément tolérantes à l'ozone (Mills et al., 2007).

En se basant sur cette relation pour établir des modèles d'impact globaux, Van Dingenen et al. (2009) ont montré que les pertes en rendement des grandes cultures (dont le maïs) imputables à l'ozone sont supérieures à celles dues au changement climatique. De même, Avnery et al. (2011a-b), se basant sur cette même relation, abordent la question de l'impact de l'ozone sur le rendement global du maïs, de nos jours et dans les décennies à venir. Les pertes de rendement, dues à l'ozone, sont d'une part estimées pour l'année 2000 et d'autre part projetées pour l'année 2030, en fonction de différents scénarios climatiques établis par le GIEC. Pour l'année 2000, l'estimation de la perte de rendement global pour le maïs varie entre 2,2% à 5%. Pour l'année 2030 les pertes de rendement sont estimées entre 2,5 et 6% ([Fig.11](#)).

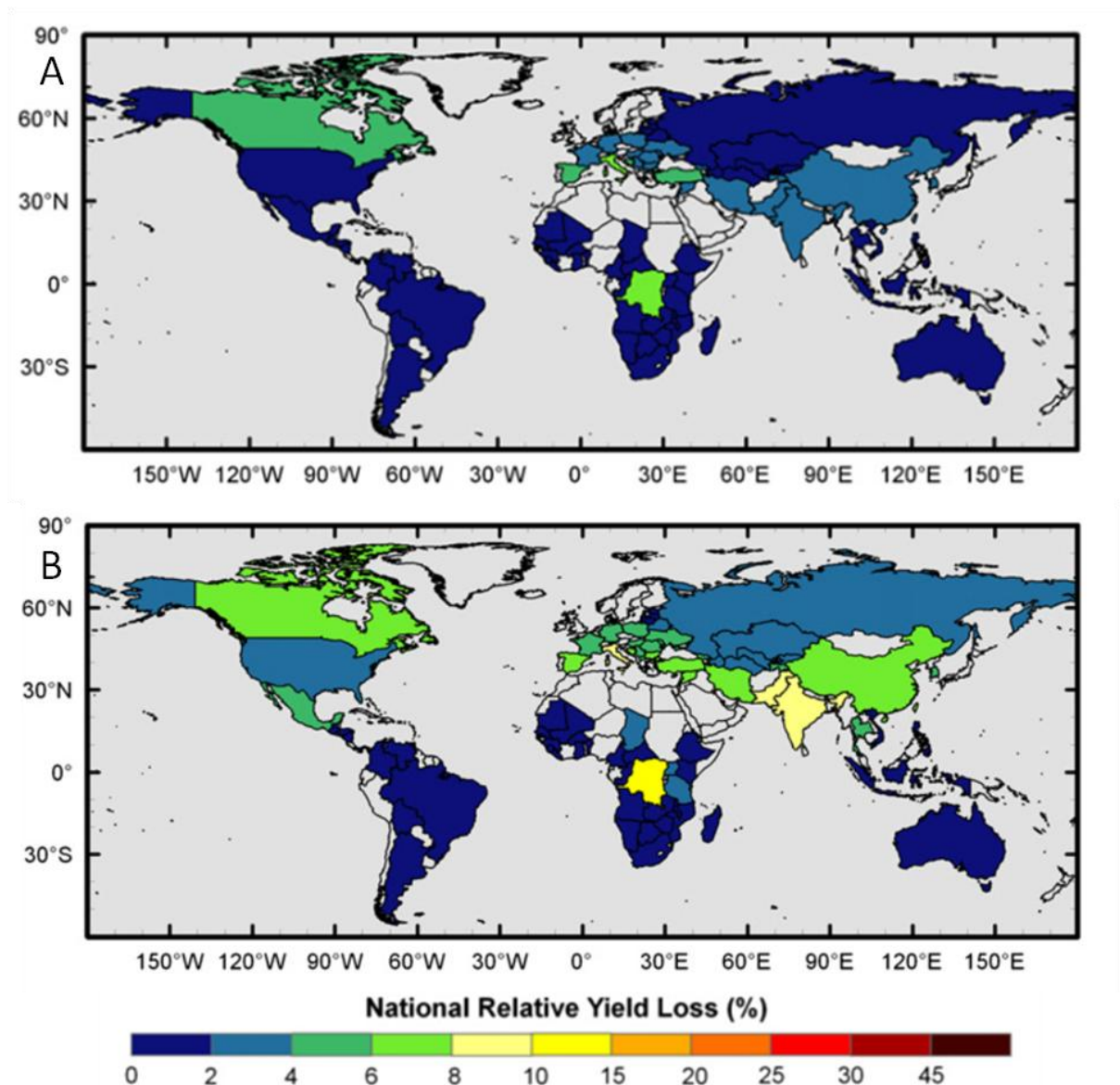


Figure 7 : Perte en rendement relative à l'ozone pour les années 2000 (A) et 2030 (B) d'après le scénario A2 du GIEC (Avnery et al. 2011)

II]-5-3 SYMPTOMES FOLIAIRES

Les symptômes foliaires furent les premiers témoignages de l'effet de l'O₃ sur les plantes (Haagen-smit, 1952). Ils peuvent se traduire par des taches chlorotiques ou nécrotiques réparties en pointillés sur les feuilles, et/ou par une augmentation des teneurs en anthocyanes ([Fig.7](#)) (Wilkinson et al., 2012; Singh et al., 2014b). Ces symptômes correspondent à une accumulation de radicaux libres qui agissent directement sur l'intégrité des cellules ou se comportent comme des molécules signal

entraînant des phénomènes de mort cellulaire (Iriti and Faoro, 2007; Tamaoki, 2008). Ce type d'altérations foliaires a fréquemment été observé en Amérique du Nord et en Europe, où les cultures irriguées méditerranéennes sont les plus touchées (Ashmore, 2005) mais également en Asie (Singh et al., 2014a). De tels dégâts visibles ont des conséquences négatives sur les rendements des plantes cultivées car ils correspondent à une diminution de la surface foliaire fixatrice de carbone. De plus, les pertes de rendement sont encore plus sévères pour les cultures dont la biomasse aérienne représente le produit récolté (laitue, luzerne, maïs...), ou pour les plantes horticoles dont l'aspect général détermine la valeur marchande (Wilkinson et al., 2012).

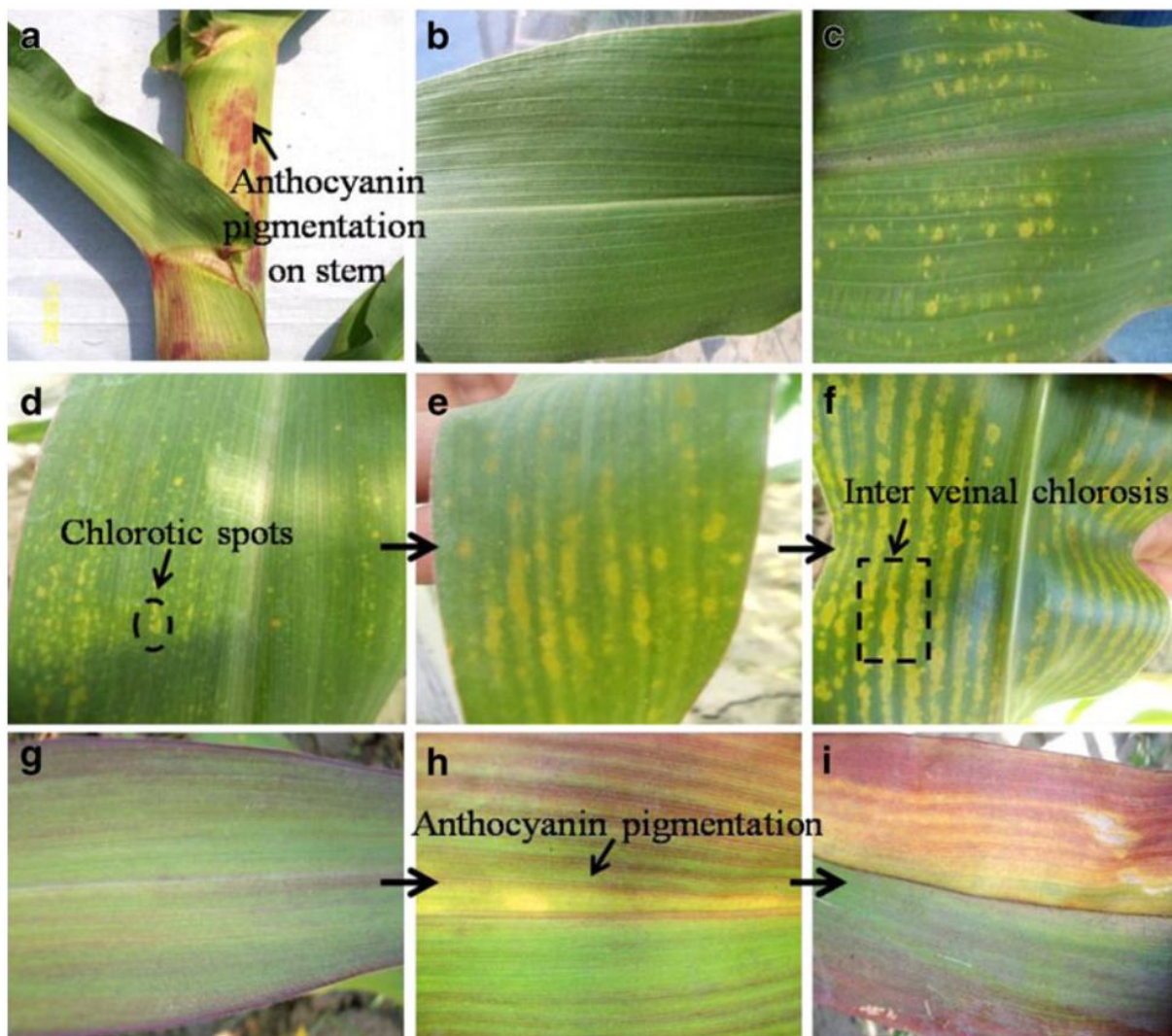


Figure 8 : Dommages sur la biomasse aérienne du maïs, induits par une surexposition à l'ozone. (Singh et al., 2014)

L'ozone représente un risque pour les plantes, cependant comme dit

précédemment, elles présentent différents niveaux de sensibilité. Afin de comprendre à quoi sont dues ces différences de vulnérabilité, nous proposons une rapide approche du devenir de l'ozone dans les tissus foliaires et les mécanismes de défenses dont dispose les végétaux pour lutter contre l'ozone.

II]-5-4 EFFETS «CELLULAIRES»

II]-5-4-1 ENTREE DE L'OZONE DANS LES FEUILLES

Pour comprendre les effets nocifs de l'ozone sur les rendements des cultures, il est nécessaire de comprendre comment il pénètre dans les tissus. La perméabilité de la cuticule des feuilles étant quasiment nulle (Kerstiens and Lendzian, 1989), c'est par les stomates que l'O₃ pénètre dans la cavité sous-stomatique. Il est largement admis que la première défense des plantes correspond d'ailleurs à une fermeture des stomates, ce qui constituerait une stratégie d'évitement (Pearson, 1995; Overmyer et al., 2008). Ainsi, le nombre de stomates, leur taille et leur ouverture régulent l'intensité des flux d'O₃ depuis le milieu extérieur vers la cavité sous-stomatique.

La fermeture des stomates dépend du fonctionnement des cellules de gardes dont l'activité dépend elle-même des canaux ioniques. Chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple, l'une des premières réponses de la plante à une exposition à l'ozone, est l'augmentation de l'activité des canaux calciques (de la membrane plasmique et du tonoplaste) en réponse à la présence de ROS. Ceci entraîne une augmentation des teneurs en calcium cytosolique dans les cellules de gardes, à l'origine de leur fermeture (Evans et al., 2005; Fiscus et al., 2005). Les canaux anioniques jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la conductance stomatique. Deux types en particulier permettent la fermeture stomatique en réponse à l'ozone : ceux de type R (*rapidly deactivating*) et ceux de type S (*slowly deactivating*) (Vainonen and Kangasjärvi, 2015). Cependant la réponse des stomates à l'ozone peut s'avérer plus complexe.

Par exemple, Vahisalu et al. (2010) ont mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana*, qu'une exposition à 250 nL.L⁻¹ d'ozone entraîne une diminution de 40% de

la conductance stomatique en moins de 10 minutes. Cet effet s'estompe dans les 40 minutes qui suivent (Fig.8) et précède une nouvelle diminution de la conductance stomatique qui pourrait correspondre aux effets de l'ozone sur les stomates généralement rapportés dans la littérature. L'usage de mutants *s/lac1* a permis de mettre en évidence l'importance des canaux anioniques de type S dans la réponse rapide des stomates à l'ozone.

Notons également que dans certains cas, l'ozone est responsable de perturbations dans le processus de fermeture des stomates (Mills et al., 2009; Wilkinson and Davies, 2010), ce qui facilite l'influx du polluant à l'intérieur des tissus foliaires. Par exemple, dans le cas d'études combinant une exposition à l'ozone et des contraintes connues pour réduire la conductance stomatique, (sécheresse, augmentation du CO₂ atmosphérique), l'effet protecteur attendu n'est pas aussi efficace que celui prévu par les modèles de conductance stomatique et des réponses stomatiques ralenties sont observées (« Sluggishness »).

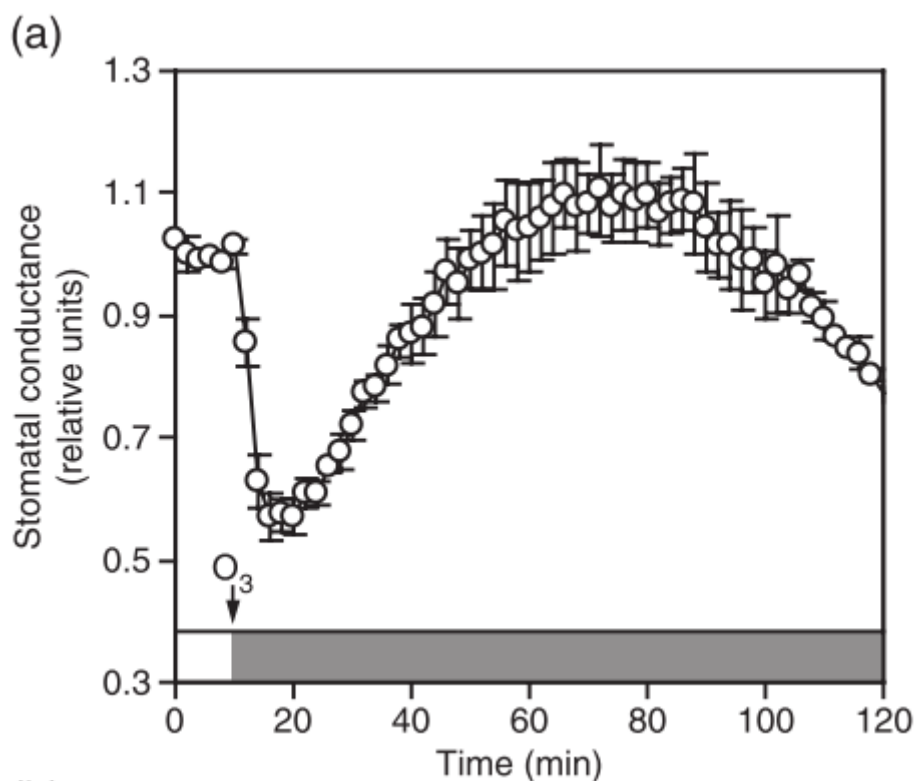


Figure 9 : Induction par l'ozone d'une décroissance rapide de la conductance stomatique (Vahisalu et al., 2010)

Dans tous les cas, la fermeture des stomates n'est jamais immédiate et

complète dès le début d'une exposition à de fortes concentrations en ozone. Ainsi, des molécules du polluant se retrouvent dans les tissus foliaires, plus précisément dans les chambres sous-stomatiques où elles peuvent : 1) réagir avec les parois et membranes cellulaires, selon des réactions d'ozonolyse qui entraînent des peroxydations lipidiques et une altération de la fluidité membranaire ; 2) se décomposer spontanément en espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive oxygen species*) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($HO^{\cdot}$) (Castagna and Ranieri, 2009; Caregnato et al., 2013). A notre connaissance, les paramètres influençant l'équilibre entre les points 1) et 2) ne sont pas encore connus.

III]-5-4-2 SYSTEMES ANTIOXYDANTS : DETOXICATION DES ROS

Les plantes disposent d'autres mécanismes de défense que la régulation stomatique, pour faire face à l'ozone. L'un d'entre eux consiste à mettre en œuvre leurs capacités de détoxification des ROS, via par exemple, les réactions du cycle d'Halliwell-Asada-Foyer ([Fig.9](#)) qui représentent d'une manière générale la principale voie métabolique de prévention des stress oxydants (Castagna and Ranieri, 2009). L'ascorbate apoplastique (AsA) est considéré comme le principal anti-oxydant permettant de lutter contre les sous-produits de l' O_3 , en présence desquels il est oxydé en déhydroascorbate (DHA) (Foyer and Noctor, 2009). L'AsA peut également servir de substrat à l'Ascorbate Peroxydase (APX) qui réduit l' H_2O_2 en H_2O et produit du Monodéhydroascorbate (MDHA). Le MDHA peut être recyclé par réduction en AsA dans le cytosol grâce à la Monodéhydroascorbate Réductase (MDHAR), réaction consommant une molécule de $NADPH_2$ issue de la photosynthèse. Toutefois, si la charge oxydante est élevée, l'AsA présent dans l'apoplasme ne suffit pas à éliminer l'excès de ROS et à prévenir les risques pour la plante. Le pool d'AsA apoplasmique peut être rapidement renforcé par transfert d'anti-oxydants provenant du cytosol, compartiment dans lequel l'activité déhydroascorbate réductase (DHAR) permet la régénération du DHA en AsA grâce à l'oxydation d'une molécule de glutathion réduit (GSH). Le GSH peut également réagir directement avec les ROS cytoplasmiques. Dans toutes ces réactions d'oxydoréduction, c'est la forme réduite GSH qui est impliquée et qui se retrouve oxydée (GSSG). Le GSH peut être régénéré par la

Glutathion Réductase (GR) et une molécule de NADPH_2 issu de la photosynthèse (Foyer and Noctor, 2011). Les ROS qui n'ont pas été neutralisés par les mécanismes de détoxification apoplasmiques peuvent diffuser vers le cytosol et créer un environnement pro-oxydant à l'intérieur des cellules et entraîner une néosynthèse de ROS endogènes dont certains jouent le rôle de molécules signal (Suzuki et al., 2011). Ce processus de génération de ROS peut se propager dans le cytoplasme et affecter les mitochondries, les peroxysomes et les chloroplastes. De plus, temporellement, il peut se poursuivre au-delà de l'épisode de pollution, occasionnant des séries de vagues de radicaux libres qui, similairement à des réactions en chaîne, atteignent les cellules voisines. Ce phénomène est appelé «burst oxydatif». Il est comparable à celui déclenché lors de la réaction d'hypersensibilité à certains pathogènes, qui se traduit par des altérations des protéines membranaires et pariétales et peut aboutir au programme de mort cellulaire (*Programmed Cell Death, PCD*) (Joo et al., 2005; Kangasjärvi et al., 2005) et à l'émission de molécules signal (Langebartels et al., 2002). A l'échelle macro-cellulaire, il en résulte un ensemble de dommages foliaires, tels que des nécroses, une sénescence précoce et l'abscission des feuilles (Leitao et al., 2007a; Bagard, 2008).

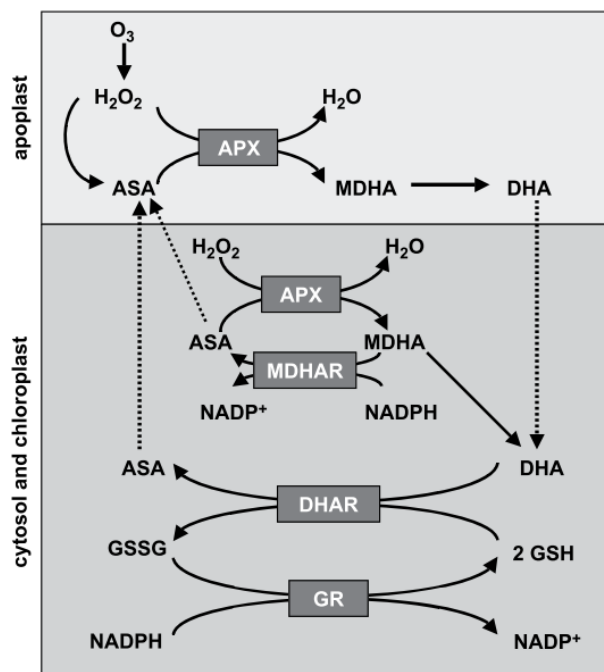


Figure 10 : Cycle Halliwell-Asada-Foyer ; Réactions d'oxydo-réduction dans une cellule végétale en réponse à l'ozone (Castagna & Ranieri, 2009).

II]-5-5 REGULATION HORMONALE

En plus de leurs effets potentiellement négatifs sur le métabolisme cellulaire, les ROS jouent également des rôles dans la signalisation, notamment dans les voies de réponse de certaines phytohormones. En effet, en réponse à la présence d'O₃ et/ou de ROS, les phytohormones jouent des rôles importants dans la mise en place des mécanismes de transduction du signal et du PCD. Il n'est donc pas surprenant de constater leur accumulation chez les plantes surexposées à l'ozone (Kangasjärvi et al., 2005). Ainsi, l'éthylène (ET) favorise la production des ROS endogènes et des lésions tout comme l'acide salicylique (SA), qui est également impliqué dans la régulation du PCD ; l'acide jasmonique (JA) quant à lui s'oppose à la propagation des lésions et contribue à contenir le processus de PCD ; enfin l'acide abscissique (ABA) influence l'ouverture des stomates (Overmyer et al., 2003; Kangasjärvi et al., 2005; Overmyer et al., 2008).

II]-5-5-1 ETHYLENE

L'éthylène est connu pour répondre aux stress biotiques et abiotiques ; il est également connu pour son implication majeure dans les processus de maturation, d'abscission et de sénescence accélérée (Wagstaff et al., 2002; Koyama, 2014). Ce dernier point est confirmé par l'étude de Lim et al. (2007) qui rapportent le cas de deux mutants d'*A. thaliana*, *ethylene-resistant 1 (etr1)* et *ethylene-insensitive 2 (ein2)*. Ils connaissent tous deux des retards de sénescence et se caractérisent respectivement par des défauts dans la perception de l'éthylène et par des défauts dans la transduction du signal. Ces observations confirment l'importance de l'ET endogène dans les processus de sénescence. Lors d'une exposition à l'ozone, l'une des premières réponses transcriptionnelles est l'induction des gènes codant pour la synthèse de l'éthylène ou pour celle de son précurseur immédiat, l'acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique (ACC) (Langebartels et al., 2002; Overmyer et al., 2008). L'ET étant connu également pour ses effets inhibiteurs sur la croissance des tiges et des racines, il a été suggéré que l'effet de l'ozone sur la perte de biomasse aérienne et racinaire pouvait être due à l'ET plutôt qu'à une diminution de la fixation du carbone ou tout du moins à une combinaison de ces deux effets (Wilkinson et al.,

2012). L'augmentation des teneurs en ET induite par l'ozone serait également responsable de la réduction de sensibilité des stomates à l'ABA et donc de l'action négative de l'ozone sur la fermeture stomatique de certaines espèces végétales (Wilkinson and Davies, 2009-2010). Il semble que ce soit le cas chez l'astéracée *Leontodon hispidus*, chez qui les stomates en réponse à l'ozone perdent leur sensibilité à l'ABA, ce qui les empêche de fermer leurs stomates. Toutefois les plantes prétraitées au 1-méthylcyclopropène (1-MCP), un antagoniste de l'éthylène retrouvent leur sensibilité à l'ABA et régulent normalement leur conductance stomatique, démontrant ainsi l'impact négatif de l'ET sur la fermeture stomatique (Wilkinson and Davies, 2009-2010).

Yoshida et al. (2009) ont mis en évidence chez des mutants d'*A. thaliana ein2* l'existence de fortes teneurs en radicaux $O_2^{\cdot -}$ en réponse à l'ozone (pas chez le phénotype sauvage Col-0). Contrairement aux précédents, ces résultats suggèrent une action protectrice de l'éthylène face à l'ozone. Pour approfondir cette idée, les auteurs ont réalisé une analyse *macroarray* dont les résultats montrent un effet positif de l'éthylène sur le métabolisme du glutathion réduit. L'action protectrice de l'ET contre l'ozone semble impliquer une synthèse *de novo* de GSH, ce qui est confirmé par une augmentation des teneurs en GSH chez Col-0. Ainsi Yoshida et al. (2009) avancent l'hypothèse d'une concentration optimale d'éthylène pour expliquer les réponses contradictoires observées chez les plantes surexposées à l'ozone.

III]-5-5-2 ACIDE SALICYLIQUE

D'une manière générale, l'acide salicylique (SA) est impliqué dans le déclenchement du processus de PCD. Le rôle de cette hormone en réponse à l'ozone a été établi grâce aux travaux menés sur des plants d'*A. thaliana*, NahG qui dégradent le SA (Rao and Davis, 1999) et *npr1* qui sont insensibles à SA (Overmyer et al., 2003; Kangasjärvi et al., 2005). Pour ces deux génotypes, l'induction du PCD induite par traitement à l'ozone a été supprimée. Toutefois, comme pour l'ET, les effets de l'acide salicylique sont dépendants de la concentration : l'hormone est nécessaire à la plante pour affronter les différents stress auxquels elle est soumise mais une accumulation de SA déclenche le PCD.

II]-5-5-3 ACIDE JASMONIQUE

Contrairement aux composés présentés précédemment, l'acide jasmonique (JA) est une phytohormone connue pour limiter les lésions foliaires induites par l'ozone. Encore une fois, ceci a été établi chez des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la voie de signalisation à JA et qui sont le plus souvent hyper-sensibles à l'ozone (Tamaoki, 2008). Sa propriété d'inhibition des lésions foliaires passerait par son action antagoniste à celle de l'éthylène. Tuominen et al. (2004) ont étudié comment l'ET et le JA influencent le développement des lésions foliaires en réponse à l'ozone. Ils ont démontré que l'effet protecteur de l'acide jasmonique est en partie dû au fait qu'il s'oppose à l'action de l'éthylène en bloquant la voie de signalisation à l'ET au niveau de ses récepteurs ([Fig.10](#)). Toutefois, le mutant *JA-insensitive (jin1)* est lui tolérant à l'ozone, ce qui suggère que JA joue lui aussi des rôles contrastés dans la réponse des plantes à l'ozone (Kangasjärvi et al., 2005). De plus, Tosti et al. (2006) ont montré sur *Arabidopsis* une réponse précoce de JA à l'ozone. Ils ont en effet identifié cinq gènes de la voie de biosynthèse de JA qui sont surexprimés peu de temps après le début de l'exposition à l'ozone. (Castagna et al., 2007) ont quant à eux observé chez la tomate une accumulation des transcrits AOS2 et AOC (d'autres gènes de biosynthèse de JA).

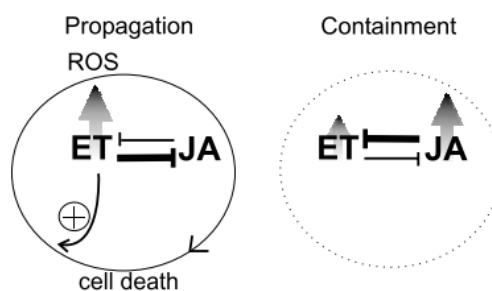


Figure 11 : Regulation de la mort cellulaire, induite par l'ozone, par l'antagonisme réciproque de l'éthylène et l'acide jasmonique (Tuominen et al., 2004)

II]-5-5-4 ACIDE ABSCISSIQUE

Comme on l'a indiqué précédemment l'effet de l'ozone sur les stomates est variable : il semble pouvoir déclencher ou gêner leur fermeture, ce qui limite ou facilite son entrée dans les tissus foliaires. Compte tenu du rôle prépondérant de l'acide abscissique (ABA) dans la régulation de la fermeture stomatique, il semble justifié d'étudier son métabolisme en réponse à une exposition à l'ozone. Il a ainsi été mis en évidence que l'ozone entraînait, chez certaines plantes, la synthèse *de novo* d'ABA. Par exemple, la fabacée *Pueraria thomsonii* Benth. synthétise rapidement de l'ABA en fonction de la concentration en polluant (Sun et al., 2012). Des mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'ABA ont permis d'établir le rôle protecteur joué par cette phytohormone dans la réponse des plantes à l'ozone. Par exemple chez le mutant *abi2-1* qui exprime une version non fonctionnelle de la phosphatase ABI2 indispensable à la réponse à l'ABA, une exposition à l'ozone n'entraîne pas la fermeture des stomates, contrairement à ce qui est observé chez le phénotype sauvage (Vahisalu et al., 2010). Toutefois cette fonction protectrice peut être amoindrie par l'ET qui réduit la sensibilité des stomates à l'ABA, comme on l'a vu précédemment (Mills et al., 2009).

Cette approche des rôles de l'éthylène de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'acide abscissique dans la réponse des plantes à l'ozone est sans doute un peu simpliste compte tenu de leurs nombreuses interactions. L'étude récente de Xu et al. (2015) sur des mutants *A. thaliana* suggère en effet une action combinée (agonistes et antagonistes) des phytohormones dans la régulation des ROS apoplastiques, du PCD et des changements dans l'expression des gènes en réponse à l'ozone.

II]-6 MODIFICATION DES PROTEINES EN REPONSE AUX STRESS OXYDANTS

Les cellules végétales produisent continuellement des ROS comme composés secondaires du métabolisme aérobie. L'impact des stress environnementaux se

traduit généralement par une augmentation de la production de ROS endogènes. Les ROS peuvent réagir avec l'ensemble des macromolécules (ADN, ARN, lipides, protéines...) (Iriti and Faoro, 2007). Parmi celles-ci, les protéines semblent particulièrement sensibles et constituent des marqueurs fiables du stress oxydant. Compte tenu de leurs rôles clefs dans les processus physiologiques des cellules vivantes (catalyse, réception chimique, architecture cellulaire), toute modification des protéines par oxydation peut s'avérer néfaste. Néanmoins, ces modifications peuvent également servir à lutter contre les dommages oxydatifs en contribuant à la transduction de signaux (Foyer and Noctor, 2011). Les plantes semblent en effet disposer de systèmes de perception leur permettant de distinguer l'origine des ROS et d'adapter leurs réponses en induisant l'expression spécifique de gènes dans les compartiments cellulaires concernés (Gadjev et al., 2006). Si le fonctionnement de ces systèmes est encore méconnu, une des hypothèses avancées est que ce sont les peptides issus de la dégradation des protéines oxydées qui jouent le rôle de messagers secondaires des ROS et permettent la spécificité du signal. L'origine des protéines dégradées informe sur la localisation du stress oxydant, le nombre de peptides détectés traduit quant à lui l'intensité du stress et enfin le type de résidus aminoacides affectés est un indicateur du type de ROS en cause (Møller and Sweetlove, 2010; Chmielowska-Bak et al., 2015).

Les résidus cystéyle et méthionyle sont parmi les plus sensibles à l'oxydation, cette sensibilité étant à mettre sur le compte du groupement soufre qu'ils contiennent. Certaines des modifications qui les touchent sont réversibles, ce qui leur permet de jouer un rôle important dans le métabolisme cellulaire, permettant des gains et des pertes de fonctions protéiques (Shacter, 2000). C'est le cas de la formation des ponts disulfures entre deux résidus cystéyle, qui fait suite à l'oxydation du groupement thiol par les ROS et dont la forme réduite peut être régénérée *via* la thioredoxine (Trx) (Møller et al., 2007). L'oxydation de la méthionine peut également être réversible. Gustavsson et al. (2002) rapporte le cas d'une petite protéine chaperon chloroplastique, la *Heat shock protein 21* (HSP21), inactivée par sulfoxydation de la méthionine mais qui peut retrouver son activité grâce à la *methionine sulfoxide réductase* qui catalyse la réaction de réduction par la Trx.

La carbonylation est la forme la plus courante de modification par oxydation des protéines. C'est une forme d'oxydation irréversible pouvant affecter les chaînes latérales de nombreux acides aminés tels que l'arginine, l'histidine, la lysine, la proline, la thréonine et le tryptophane. Le fait que la carbonylation concerne des acides aminés non sulfurés indique l'existence de contraintes oxydantes fortes (Shacter, 2000; Møller et al., 2007). Elle résulte soit de l'oxydation directe des protéines par les ROS, soit de réactions indirectes avec des aldéhydes dérivés de la peroxydation lipidique, ou avec des groupements carbonyl issus de la réduction des glucides (Berlett, 1997; Smakowska et al., 2014). La fréquence, la stabilité, l'irréversibilité de la carbonylation et la relative simplicité des méthodes de détection font des protéines carbonylées un bon indicateur global des contraintes oxydantes (Bozaykut et al., 2013). Enfin, il faut préciser que l'irréversibilité de ce type de modification rend nécessaire l'élimination des protéines oxydées par les cellules, rôle qui incombe au système protéolytique par le biais des protéases et des protéasomes (Basset et al., 2002; Djebali et al., 2008).

II]-6-1 EVOLUTION DES TENEURS EN PROTEINES CARBONYLEES DURANT LE DEVELOPPEMENT FOLIAIRE

Chez *A. thaliana*, la teneur en protéines carbonylées augmente au cours de la phase végétative puis décroît rapidement au début de la phase de reproduction, se stabilisant à un niveau faible (Johansson et al., 2004). L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer cette chute soudaine de la teneur en protéines carbonylées est celle d'une stratégie visant à limiter le transfert de protéines altérées à la descendance, améliorant ainsi sa valeur sélective. Toutefois, dans le modèle de ces auteurs, le niveau d'oxydation des protéines n'augmente pas lors de la sénescence, ce qui est en contradiction avec l'idée généralement admise que le vieillissement est lié à une augmentation de la charge oxydante des tissus. (Junqua et al., 2000; Qiu et al., 2008) ont par ailleurs observé chez *A. thaliana* des teneurs en groupements carbonyl plus élevés chez les feuilles de rangs supérieurs (feuilles jeunes). Chez le maïs, les feuilles les plus jeunes présentent également des niveaux d'oxydation globaux supérieurs à ceux des feuilles plus âgées ([Fig.12](#)) (Prins et al., 2011).

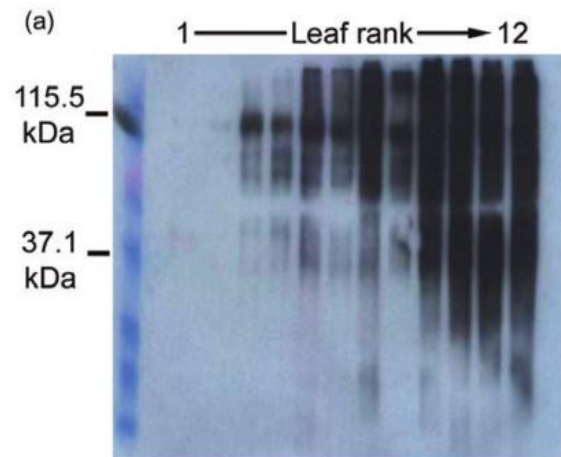


Figure 12 : Effet de l'âge sur la carbonylation des protéines foliaires, pour les feuilles 1 à 12, avec les feuilles 1 et 12 respectivement les plus âgées et les plus jeunes (Prins et al., 2011).

Les informations concernant les teneurs en groupements carbonyle au cours du développement des feuilles sont contradictoires ; il ressort toutefois que les feuilles qui se mettent en place le plus tardivement sont celles qui présentent le plus de protéines carbonylées.

II]-6-2 EVOLUTION DU NIVEAU DE PROTEINES CARBONYLEES DANS LES FEUILLES EN REPONSE A UN STRESS ABIOTIQUE

Comme évoqué précédemment, lorsque les plantes sont soumises à des contraintes environnementales, leur métabolisme surproduit des ROS endogènes avec pour conséquence fréquemment observée, l'augmentation des teneurs en protéines carbonylées.

Ainsi, les teneurs en protéines carbonylées de feuilles de blé tendre, *Triticum aestivum* L. augmentent en conditions de sécheresse, tout particulièrement dans les mitochondries et les peroxysomes (Bartoli, 2004). Une atmosphère enrichie en CO₂ ainsi qu'une exposition à l'ozone entraînent similairement des augmentations des teneurs en protéines carbonylées, chez *A. thaliana* et chez le soja (Qiu et al., 2008). De tels effets de l'ozone ont aussi été observés chez le haricot, *Phaseolus vulgaris* L. Les résultats montrent de plus, que la réponse est dépendante de la dose d'ozone reçue, le niveau de carbonylation de la petite sous-unité de la Rubisco augmentant

linéairement avec l'ozone (Leitao et al., 2003). Toutefois, l'âge des tissus joue sur la sensibilité au polluant, les plus jeunes apparaissant comme moins sensibles (Junqua et al., 2000; Leitao et al., 2003). Des travaux de la même équipe (Leitao et al., 2008) ont montré une diminution de l'activité Rubisco pouvant être expliquée en partie par les carbonylations subies. Les auteurs émettent toutefois quelques réserves à ce propos, précisant que la chute de l'activité Rubisco est également corrélée à une baisse des quantités des sous-unités de cette carboxylase et qu'une modification de l'activité de la Rubisco-activase n'est pas à écarter, tout comme une combinaison de ces facteurs (Leitao et al., 2008).

D'autres contraintes environnementales, comme une exposition au cadmium, entraînent également l'augmentation du niveau de carbonylation des protéines, dans les feuilles d'*A. thaliana* (Polge et al., 2009), du maïs (Rellán-Álvarez et al., 2006) et de la tomate (Djebali et al., 2008). Ces derniers auteurs présentent toutefois des résultats surprenants pour les racines où la teneur en groupements carbonyle diminue avec la dose de cadmium accumulée dans les tissus. Ces résultats suggèrent que les racines sont plus efficacement équipées que les feuilles pour gérer un stress oxydant induit par le cadmium.

II]-7 PROTEOLYSE CHEZ LES PLANTES

II]-7-1 MECANISME D'ACTION DES PROTEASES ET CLASSES DE PROTEASES

Les protéases peuvent se regrouper en deux grandes catégories, les endoprotéases et les exopeptidases, respectivement celles qui clivent les liaisons peptidiques à l'intérieur des protéines et celles qui les clivent aux extrémités des chaînes polypeptidiques. Les exopeptidases sont elles même subdivisées en deux sous-catégories relatives à leurs substrats, les aminopeptidases et les carboxypeptidases, respectivement celles qui clivent les liaisons peptiques au niveau du N-terminal et celles qui les clivent au niveau de l'extrémité C-terminal de la protéine ou du peptide. Les protéases procèdent toutes selon la même méthode. Elles stabilisent l'oxygène du groupement carbonyle de la liaison peptidique faisant office de substrat au niveau d'un trou oxyanion, ce qui rend l'atome de carbone plus vulnérable au nucléophile. Il existe quatre déclinaisons principales à cette méthode qui donnent leurs noms aux quatre classes principales de protéases : les protéases à

cystéine, les protéases à sérine, les protéases à aspartate et les métalloprotéases. La différence majeure entre ces quatre classes repose sur les natures des nucléophiles et des trous oxyanions (Fig.13) (van der Hoorn, 2008). Il existe enfin une dernière classification pour les protéases, établie sur la base de données MEROPS, qui les subdivise en familles puis en clans, en fonction de leurs relations évolutives (van der Hoorn, 2008; Simova-Stoilova et al., 2010; González-Rábade et al., 2011).

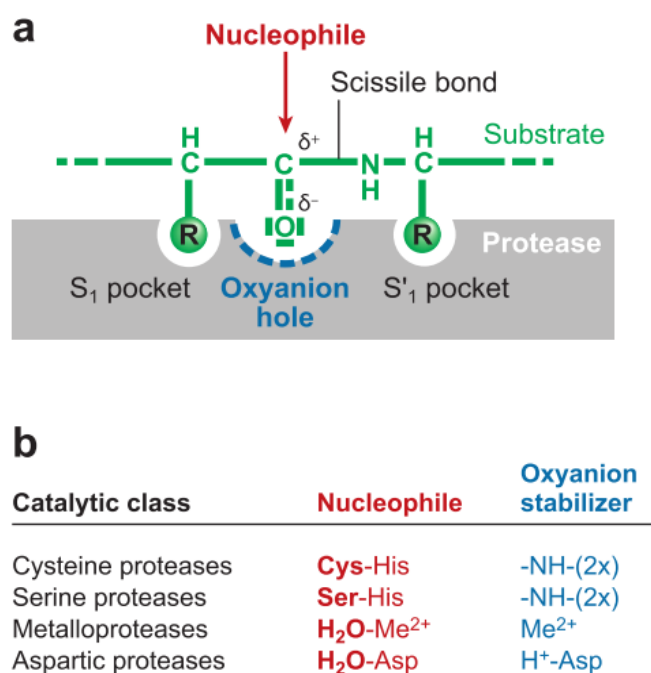


Figure 13 : Mécanismes de clivage des protéines des quatre principales classes de protéases (Van der Hoorn, 2008)

II]-7-2 PROTEASES A CYSTEINE

Les protéases à cystéine, également appelées protéase à thiol, sont parmi les plus abondantes puisqu'on les retrouve chez les procaryotes et les eucaryotes. L'activité catalytique de ces enzymes inclut l'usage d'une cystéine comme nucléophile. Chez les plantes, il existerait au moins 140 protéases à cystéine, réparties en 15 familles et en 5 clans (van der Hoorn, 2008; Rawlings et al., 2010). Elles sont impliquées dans la maturation des protéines, dans le recyclage des

protéines altérées, dans la protéolyse lors de la sénescence. Elles joueraient également un rôle dans l'accumulation des protéines de stockage dans les graines et dans leur remobilisation. Elles participent à la réponse des plantes aux stress et sont impliquées dans les voies de signalisation ainsi que dans le programme de mort cellulaire (Grudkowska and Zagdańska, 2004; González-Rábade et al., 2011; Martínez et al., 2012). Enfin elles sont responsables d'une part importante de l'activité endoprotéolytique totale des plantes bien que celle-ci varie en fonction de l'espèce et de l'organe étudié. Cependant, s'il est impossible de définir précisément la proportion de l'activité protéolytique totale qui leur est due, Grudkowska and Zagdańska (2004), avancent une part supérieure à 30 % de l'activité protéolytique totale des organes matures non sénescents allant jusqu'à 90 % pour le blé tendre (Wiśniewski and Zagdańska, 2001). Ces résultats élevés sont confirmés par Havé (2013), qui obtiennent des proportions allant jusqu'à 70 % de l'activité protéolytique totale chez un blé tendre non stressé et jusqu'à 80 % pour des individus surexposés à l'ozone.

II]-7-3 PROTEOLYSE ET OZONE

L'influence de l'ozone sur la protéolyse n'a fait l'objet que de peu d'études jusqu'à présent qui de plus concernent un nombre réduit d'espèces végétales. Chez le peuplier une exposition à des doses d'ozone comprises entre 60 et 100 ppb, quatre heures par jour pendant 60 jours, entraîne une baisse des activités protéolytiques totales (Landry and Pell, 1993). Chez une variété de tabac sensible à l'ozone, une exposition aiguë pendant 5 heures à 150 ppb d'ozone stimule l'activité protéolytique totale et l'usage d'inhibiteurs spécifiques suggère l'implication de protéases à cystéine et sérine (Pasqualini et al., 2003). L'étude la plus complète à ce jour a été réalisée chez le blé. Les activités protéolytiques totales et spécifiques des quatre grandes classes de protéases ont été suivies chez deux cultivars de blé exposés de façon chronique à l'ozone, pendant 56 jours. Les conclusions de cette étude révèlent une augmentation chez les deux cultivars de l'activité totale en réponse à l'ozone. De plus cette augmentation survient d'autant plus précocement que les niveaux d'expositions sont élevés. Les auteurs rapportent également le rôle principal joué par les protéases à

cystéine dans cette augmentation (Havé, 2013). Enfin, chez le maïs, il a été montré qu'une exposition chronique à l'ozone pendant 50 jours pouvait entraîner à la fois une augmentation des transcrits de métacaspase de type II (MCII) mais également de leurs activités chez les plants exposés aux plus fortes doses d'ozone (21,6 ppm.h après 50 jours d'exposition) suggérant une régulation post-transcriptionnelle et l'existence d'un effet seuil (Ahmad, 2012)

III] OBJECTIFS

Les connaissances actuelles sur les réponses du maïs à l'ozone sont limitées. Au vu de l'importance économique de cette espèce végétale, il nous a paru essentiel de contribuer à pallier aux lacunes dans ce domaine. Pour y parvenir, nous avons choisi de focaliser notre étude sur l'impact de l'ozone sur le rendement du maïs, résultante finale du cycle de développement des plantes, donc totalement intégré à l'échelle de la plante. De plus, le rendement est un paramètre transversal qui rassemble sans difficulté les mondes de la recherche et de l'agriculture. Ce caractère pourrait faciliter les retombées de l'étude d'un domaine vers l'autre, s'il y a lieu.

L'approche scientifique adoptée dans ce travail est elle aussi transversale et inclut des mesures agronomiques, physiologiques et biochimiques dont l'objectif global est d'élargir la base de données sur les effets de l'ozone sur le maïs afin de reconsidérer l'ensemble des connaissances acquises sur le sujet. En effet, préalablement à ce travail, seules des études réalisées en chambres de fumigation d'ozone à ciel ouvert (OTCs) ont été mises en œuvre pour évaluer les effets de l'ozone sur la physiologie et les rendements du maïs. Si elles ont permis de modéliser les conséquences potentielles qu'auraient les concentrations futures d'ozone sur les rendements de maïs, elles ne suffisent pas à établir des projections réalistes de rendement pour les années à venir. C'est pourquoi, dans la mesure du possible, les différents éléments assemblés dans ce travail s'accorde avec à la réalité d'une exploitation agricole. Ainsi, un nouveau système d'enrichissement de l'air en ozone simulant au mieux les épisodes de pollution actuels et futures et limitant au maximum les effets collatéraux sur le microclimat des plantes a été mise au point. La parcelle expérimental est installée sur la station de l'INRA-AgroParisTech, à Thivernal Grignon (48° 50' N, 1° 57' E), c'est-à-dire dans un espace totalement ouvert aux conditions classiques de culture (pratiques culturales, variations climatiques, échelle de culture...). Le cultivar de maïs NK Perform (*Syngenta*), est un hybride fréquemment cultivé par les agriculteurs et a été choisi pour ce motif et pour ses qualités agronomiques

Le choix qui a été fait d'aborder cette expérimentation à différents niveaux d'intégration au travers de paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques, devrait permettre d'esquisser une vision d'ensemble et réaliste du comportement du maïs sous l'effet de l'ozone. Les résultats obtenus dans telles conditions, devraient donc permettre de mieux comprendre le comportement du maïs en réponse à des doses croissantes et réalistes d'ozone et de contribuer à l'établissement de projections d'impact de l'ozone sur cette culture.

IV] MATERIELS ET METHODES

IV]-1 SITE EXPERIMENTAL

En 2011, des plants de maïs (*Zea mays*, L. cv. NK Perform) ont été cultivés sur la parcelle expérimentale de la ferme de l'AgroParisTech (Thiverval Grignon, France, 48° 51'N, 1° 55'E et à une altitude d'environ 130 m), située à environ 40 km à l'ouest de Paris (France). La parcelle expérimentale s'étend sur 19 ha et se compose d'un sol de loam limoneux. Le climat est semi continental, avec des épisodes pluvieux répartis sur toute l'année. Les vents dominants viennent de l'ouest mais il arrive que des vents de nord ou de nord-est prédominent pendant les périodes anticycloniques.

IV]-2 SYSTEME DE FUMIGATION ET CONDITION D'EXPOSITION A L'OZONE

. Le principe de base de ce système repose sur l'installation d'une rampe linéaire de fumigation (e.g. source d'ozone) orientée perpendiculairement à la direction du vent dominant de façon à ce que la concentration en ozone décroisse régulièrement en aval de la rampe, au fur et à mesure de sa dilution dans le flux d'air. Ce dispositif de fumigation est constitué de deux cylindres linéaires inoxydables de 50 mètres de long placés respectivement à 1.3 m et 1.4 m du sol et muni chacun d'aiguilles de diamètres calibrés placées tous les 25 cm afin d'assurer une diffusion homogène du polluant. Ces rampes sont reliées à un générateur d'ozone (CMGL 100-4, Innovatec Gerätetechnik GmbH, Germany) à l'aide de tuyaux en téflon. La production d'ozone est automatisée et résulte de l'application de décharges électriques dans un flux d'oxygène dès lors qu'un certain nombre de conditions énoncées ci-dessous sont remplies. Le débit et la pression du système sont régulés afin d'avoir un flux/dose constante d'ozone au niveau des aiguilles de la rampe (60g h⁻¹). Les vents dominants ont été utilisés comme vecteurs naturels de dispersion de l'ozone (Grünhage and Jäger, 2003). Ce dernier point présente comme avantage de permettre l'établissement d'un gradient de concentration à partir de la source d'ozone (e.g. de la rampe). Le fonctionnement du générateur d'ozone est dépendant d'un

certain nombre de conditions climatiques suivies en temps réel au moyen de deux stations météo. Ces stations ont permis de suivre des paramètres comme la température, l'éclairement, l'hygrométrie, la direction, vitesse du vent... Lorsque l'intensité lumineuse correspondait à un rayonnement global supérieur à 50 W.m^{-2} , avec des vents d'ouest ($270^\circ \pm 45^\circ$), une vitesse comprise entre $0,8 \text{ m.s}^{-1}$ et 4 m.s^{-1} , le dispositif de fumigation était activé générant et diffusant l'ozone en continu. Le générateur était automatiquement éteint la nuit, lors des épisodes pluvieux, ou lorsque la direction du vent ne correspondait pas à celle des vents dominants. Grâce au dispositif, les concentrations d'ozone à proximité de la rampe étaient supérieures aux niveaux naturels observables à proximité de la source de fumigation, et diminuaient régulièrement avec la distance depuis la zone d'émission (Fig.14). Les mesures (par absorption UV ; analyseurs 41M and 42M, Environnement SA, France) et l'enregistrement périodique des concentrations en ozone sont automatisées et informatisées.

La période de fumigation s'est étendue du 2 juillet 2011 (Jours Julien JJ 183) au 31 août 2011 (JJ 243). L'étude des effets sur le maïs d'une exposition à l'ozone est basée sur la comparaison entre des plantes témoins, qui se sont développées à 15 m en amont du panache de la source d'ozone, et des plantes exposées à l'ozone, qui ont poussé à 3,5 m et 2 m en aval du panache de la rampe de fumigation (Fig.14). Les concentrations d'ozone ont été mesurées pendant toute la durée de l'expérimentation au niveau de ces points.

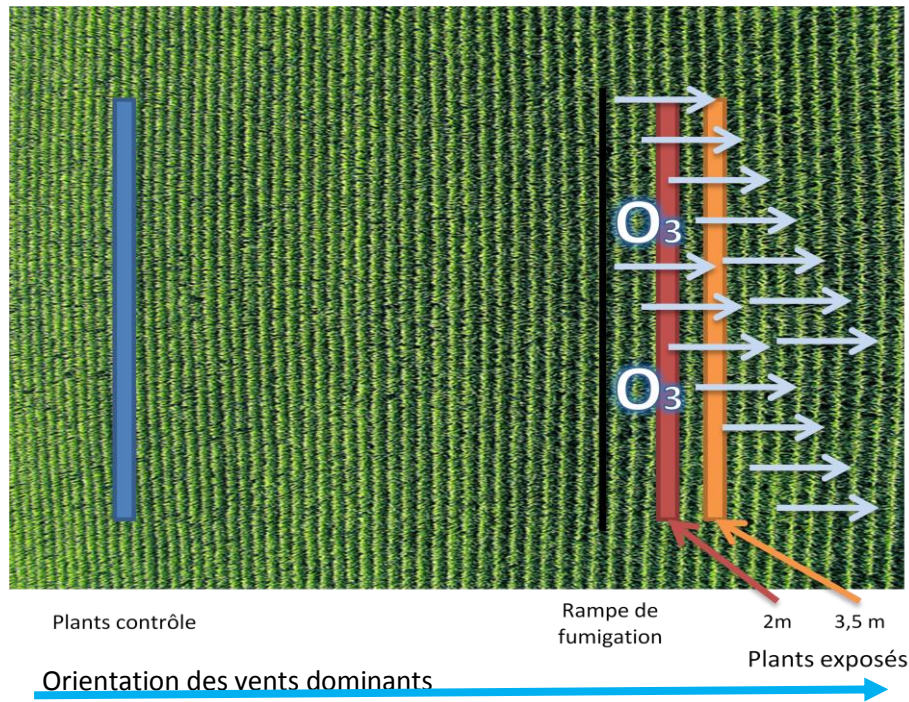


Figure 14 : Schéma du dispositif de fumigation à l'ozone

IV]-3 INDICE D'EXPOSITION A L'OZONE

Tout au long de la période de fumigation, les concentrations en ozone ont été mesurées toutes les 10 minutes à l'aide de deux analyseurs. Les données collectées ont servi à calculer les concentrations horaires moyennes et le cumul des concentrations d'ozone au-delà d'un seuil de 40 ppb, c'est-à-dire l'AOT40 (*Accumulated Ozone over a Treshold of 40 ppb*). L'AOT40 a été calculé comme la somme des différences entre la concentration moyenne horaire d'ozone et la valeur seuil de 40 ppb quand la moyenne des concentrations horaires d'ozone dépassait ce seuil de 40 ppb et que le rayonnement global était d'au moins 50 W.m^{-2} . Ce paramètre d'exposition à l'ozone est défini comme étant la concentration critique permettant d'évaluer l'effet de l'ozone sur les cultures en Europe (Fuhrer, 1997; Grünhage et al., 1999).

IV]-4 MATERIEL VEGETAL ET CULTURE DU MAÏS

Les caryopses de maïs (*Zea mays*, L. cv. NK Perform) ont été semés le 21 avril 2011 à 5 cm de profondeur en rangs espacés de 75 cm, pour une densité de $9,24 \text{ plants.m}^{-2}$, selon une orientation nord-ouest / sud-est sur une parcelle

préalablement fertilisée avec du fumier de vache. Les pratiques culturales classiquement mises en œuvre en région Il De France ont été utilisées. Des traitements herbicides ont été appliqués le 13 mai 2011 et correspondaient aux substances actives suivantes, nicosulfuron (Milagro), mesotrione (Callisto) et de bromoxynil (Cadel), aux dosages respectifs de 0,5 L.ha⁻¹ pour les deux premiers et de 0,4 L.ha⁻¹ pour le dernier. L'émergence du coléoptile a eu lieu le 3 mai et la floraison observée le 11 juillet 2011. Les précipitations étant suffisantes et régulières, il n'a pas été utile d'irriguer la parcelle au cours de l'expérimentation.

IV]-4 1 PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS VEGETAUX

Pour chaque date de prélèvement, les portions médianes (environ 10 cm) de 6 feuilles de l'épi ont été prélevées sur 6 plants témoins et 4 plants surexposés à l'ozone situés à 2 m et 3,5m de la source d'ozone, dans le sens des vents dominants. Les échantillons de feuilles prélevés ont été congelés immédiatement après récolte dans l'azote liquide et conservés à -80°C en vue des analyses biochimiques ultérieures.

De plus, deux campagnes de récolte des plants entiers ont également été réalisées sur des plants matures. Le 5 septembre 2011 ; 20 plants entiers ont été collectés par condition d'exposition alors que 32 l'ont été par condition d'exposition le 3 octobre 2011 ([Tableau.2](#)). Ces plants ont été séchés en serre avant broyage au moulin à grains des différents organes destinés aux analyses agronomiques.

Tableau 2 : Récapitulatif des campagnes d'échantillonnages : dates, durées de fumigation, nomenclature et organes prélevés.

Date	Jours Julien	Durée de fumigation (jours) à la date de prélèvement ou de récolte	Numéro de prélèvement / de récolte	Organes prélevés
11 juillet 2011	192	9	P1	Feuilles de l'épi
28 juillet 2011	209	26	P2	
11 août 2011	223	40	P3	
31 août 2011	243	60	P4	
5 septembre 2011	248	-	R1	Biomasse totale aérienne
3 Octobre 2011	276		R2	

IV]-5 PARAMETRES AGRONOMIQUES

IV]-5-1 ESTIMATION DES SURFACES FOLIAIRES SUR LE MAÏS

Afin d'étudier l'effet des l'ozone sur les surfaces foliaires, celles-ci ont été calculées de la façon suivante (Sanderson et al., 1981) :

Surface foliaire = Longueur de la feuille x largeur maximale de la feuille x k,

Où

k constitue un facteur correctif égal à 0,75 (Birch et al., 2003)

la longueur de la feuille est mesurée depuis la pointe jusqu'à la ligule.

IV]-5-2 QUANTIFICATION DES BIOMASSES AERIENNES

La biomasse aérienne sèche et le rendement en grains sont déterminés en pesant les organes récoltés pour chaque condition d'exposition ou contrôle et chaque réplicat biologique, après séchage en serre ; la biomasse aérienne fraîche a été obtenue par pesée juste après récolte des plants.

IV]-5-3 DETERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON DANS LES CARYOPSES

La détermination de la teneur en amidon des grains de maïs est effectuée sur environ 100 mg de farine de maïs en utilisant le kit Total Starch Megazyme Assay Procedure (Megazyme, Ireland) en suivant les préconisations du fournisseur. Ce kit reconnu par l'AOAC et l'AACC comme méthode officielle se base sur une série de digestions de l'amidon aboutissant à la libération de H_2O_2 qui après réaction avec une sonde quinoneimine permet la quantification par colorimétrie de la teneur en amidon, exprimé en pourcentage.

IV]-5-4 DETERMINATION DES TENEURS EN CARBONE ET AZOTE DANS LES TIGES, FEUILLES ET GRAINS

Les dosages de carbone et d'azote dans les organes cibles ont été réalisés par combustion sèche au laboratoire départemental d'analyse et de recherche de l'Ain. Les analyses ont été réalisées sur les échantillons issus des deux récoltes R1 et R2. Les tiges, les feuilles et les grains ont été traités à partir de matériel végétal préalablement réduit en poudre à l'aide de broyeur à grains.

IV]-6 PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES

IV]-6-1 MESURE DES TENEURS EN CHLOROPHYLLES TOTALES

Les indices de teneurs en chlorophylles (*Chlorophyll Content Index, CCI*) ont été mesurés à l'aide d'un chlorophylle-mètre CCM-200 (Opti-Sciences, USA) sur dix feuilles par traitement lors des différentes campagnes d'échantillonnage (P1-P4 ; voir [tableau.2](#)). Pour chaque feuille, deux mesures ont été effectuées au niveau de ses parties proximale, médiane et distale, soit un totale de six points de mesure par feuille. Ces six points de mesure ont ensuite été moyennés pour avoir un indice de teneurs en chlorophylles moyen par feuille. Les valeurs de CCI ont été converties en teneur de chlorophylles totales en $\mu g.cm^{-2}$ en utilisant la relation de Cerovic et al. (2012)

IV]-6-2 MESURE DES ECHANGES GAZEUX

Les mesures d'échanges gazeux ont été réalisées par l'équipe de l'INRA de Grignon. La conductance stomatique (g_s) et l'assimilation nette (A) ont été mesurées au cours la période de fumigation sur la feuille de l'épi, à l'aide d'un système portatif de mesure d'échanges gazeux Li-6400 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Ce système permet de mesurer à la fois l'évolution de la concentration en CO_2 et en vapeur d'eau d'une surface foliaire déterminée dans une chambre étanche. L'évolution de la concentration en CO_2 permet de déterminer le taux d'assimilation nette de CO_2 par unité de surface. Tandis que l'évolution de la concentration en vapeur d'eau permet de déterminer la conductance stomatique au travers des calculs du taux de transpiration et de la résistance à la diffusion de la vapeur d'eau. Les mesures ont été regroupées en moyennes flottantes centrées sur les dates de prélèvement (P1 à P4).

IV]-7 PARAMETRES BIOCHIMIQUES

IV]-7-1 EXTRACTION DES PROTEINES FOLIAIRES SOLUBLES ET MESURES DES ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUES

IV]-7-1-1 EXTRACTION

Toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Environ 250 mg de feuilles préalablement broyées dans de l'azote liquide sont mises en suspension et homogénéisées par broyage au mortier et pilon dans 5 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7.5 (50 mM) ; β -mercaptoéthanol (10 mM) ; Polyvinylpolypyrrolidone (1% m/v)). Afin d'éliminer les débris cellulaires, les broyats sont centrifugés à 25000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont prélevés et centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant final constitue l'extrait protéique soluble. Son volume est mesuré précisément. Une première fraction de l'extrait est diluée au dixième dans du tampon d'extraction pour la mesure des activités endoprotéolytiques. Une seconde fraction est destinée à la détermination des teneurs en protéines solubles selon Bradford (1976 ; cf IV]-7).

IVJ-7-1-2 MESURE DES ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUES

TOTALES

Principe

La mesure d'activité endoprotéolytique foliaire se base sur le suivi de la dégradation d'un substrat protéique artificiel. Le plus souvent, il s'agit de caséine, décrite comme un substrat universel. Elle est effectivement facilement digérée par les protéases cellulaires. Couplée à des chromophores ou à des fluorochromes, il est facile de suivre sa dégradation, soit par des mesures colorimétriques, soit par des mesures fluorométriques. Dans notre cas, nous avons développé une technique basée sur la dégradation d'un substrat fluorescent, de la caséine couplée à des fluorochromes de type BODIPY TR-X (EnzChek Protease Assay Kit, E6639). Lorsque la caséine couplée au substrat est intacte, il y a un effet de « quenching » et les fluorochromes n'émettent aucun signal. Lorsque le substrat est dégradé les résidus fluorescents sont libérés annulant progressivement le « quenching ». Le signal émis étant proportionnel à la quantité de substrat dégradé, il est possible de suivre la protéolyse en temps réel. Cette technique à l'avantage de permettre au moyen d'un fluorimètre une mesure en temps réel, évitant ainsi les étapes de précipitation et de séparation des protéines que l'on rencontre avec les techniques colorimétriques classiques.

Mesures

Les mesures d'activités endoprotéolytiques ont été réalisées en microplaques opaques noires de 96 puits compatibles pour la fluorimétrie. Les mélanges réactionnels se composent de 100 µl de substrat « BODIPY TR-X casein » resuspendus à 10 µg.ml⁻¹ dans un tampon réactionnel (MES-KOH pH 6 (200 mM), NaN₃ (2 mM)) et de 100 µl d'extrait dilué au dixième. Le blanc consiste en 100 µl d'extrait dilué au dixième et 100 µl d'eau ultrapure. Après homogénéisation, les essais sont incubés pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité puis l'acquisition des mesures de fluorescence est réalisée à intervalles de temps réguliers de 30 minutes pendant 12 heures sur un fluorimètre Biotek Synergy HT afin de suivre la cinétique de digestion du substrat. Le suivi du signal sur une période largement supérieure à celle nécessaire pour nos mesures permet de s'assurer des bonnes conditions expérimentales (substrat non limitant, blanc stable...). L'excitation se fait à 590 ± 20

nm, l'émission à 645 ± 40 nm et la sensibilité du lecteur de microplaques est réglée sur 50 (unité arbitraire). Le temps retenu pour évaluer l'activité endoprotéolytique d'un extrait est de 60 minutes.

Les essais sont réalisés en triplicats (tant pour le blanc que pour l'échantillon). Pour chaque échantillon, la valeur moyenne du signal des fluorescences du blanc est soustraite à la valeur moyenne des fluorescences de l'échantillon analysé. La valeur de fluorescence alors obtenue correspond à l'activité endoprotéolytique de l'échantillon (en unités arbitraires de fluorescence). L'activité endoprotéolytique étant dépendante du pH, une gamme de tampon de pH variant entre 5 et 9 a donc été préalablement réalisée pour définir le pH optimal utilisable dans nos conditions. . Le tampon initial est un tampon de dosage mixte Tris-HCl (200 mM), MES (100mM), Acétate de sodium (100 mM) au pH considéré. *In fine*, l'activité endoprotéolytique totale est exprimée en UA de fluorescence / mg de matière fraîche .

IV]-7-1-3 EVALUATION DES ACTIVITES SPECIFIQUES AU MOYEN D'INHIBITEURS

L'emploi d'inhibiteurs de protéases permet d'évaluer la contribution d'une famille de protéases à l'activité endoprotéolytique totale. Pour chaque mesure, 10 μ L d'inhibiteur est ajouté à 120 μ L d'extrait protéique dilué au dixième. La référence contient 120 μ L d'extrait dilué au dixième et 10 μ L de solvant de resuspension de l'inhibiteur concerné ([Tableau.3](#)). Le mélange est incubé 20 minutes à 37°C avant prélèvement de 105 μ L de chaque puit que l'on transvase dans les puits d'une nouvelle microplaque préalablement rempli avec 100 μ L de substrat BODIPY TR-X casein ([IV\]-7-1-2](#)). Le suivi de la dégradation du substrat est réalisé comme décrit précédemment ([IV\]-7-1-2](#)). Les essais sont réalisés en triplicats (pour le blanc, la référence et l'extrait). Pour chaque échantillon, la valeur moyenne du signal des fluorescences du blanc est soustraite à la valeur moyenne des fluorescences de l'échantillon analysé. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité endoprotéolytique totale. Deux familles principales de protéases ont été ciblées au moyen de deux inhibiteurs ([Tableau.3](#)).

Tableau 3 : Inhibiteurs de protéases utilisés et classes de protéases inhibées

Nom de l'inhibiteur	Famille de protéases inhibées	[Solution mère] (mM)	Concentration finale (mM)	Solvant de resuspension
E64 (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane)	Protéases à cystéine	42 μ M	2 μ M	Eau distillée
Pefabloc (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)	Protéases à sérine	42 mM	42 mM	

IV]-8 DOSAGE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE FOLIAIRES DANS L'EXTRAIT

Le 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (H_2DCFDA) est une forme réduite de la fluorescéine utilisée comme indicateur de présence des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une fois déacétylé par les estérases cellulaires, le H_2DCFDA (non fluorescent) peut être oxydé par les ROS en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) hautement fluorescent.

Une quantité connue de matière fraîche (environ 100 mg) préalablement broyée dans de l'azote liquide est resuspendu dans un 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,2 (10 mM)). La suspension est homogénéisée à l'aide d'un pilon. Afin d'éliminer les débris cellulaires, l'homogénat est centrifugé à 14000 x g pendant 5 minutes, à 4°C. La centrifugation est répétée une fois dans les mêmes conditions. Le surnageant final constitue l'extrait végétal.

Pour le dosage, le mélange réactionnel se compose de 100 μ L d'extrait végétal auxquels sont ajoutés 100 μ L de H_2DCFDA (resuspendu à 20 μ M dans du diméthylsulfoxyde (DMSO)), le mélange étant homogénéisé à la pipette. Les blancs contiennent 100 μ L de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, et de 100 μ L de H_2DCFDA . Après 10 minutes d'incubation à 22°C (température ambiante) et à l'obscurité, les

valeurs de fluorescence des essais sont mesurées à l'aide du fluorimètre (Biotek synergy HT) avec des valeurs respectives d'excitation et d'émission de 492-495 nm et 517-527 nm.

Pour chaque échantillon, les dosages sont effectués sur trois réplicats techniques, de même que pour les blancs. Pour chaque échantillon, la valeur moyenne des signaux de fluorescence du blanc est soustraite à la valeur moyenne de fluorescence émise par l'extrait analysé. La valeur de fluorescence alors obtenue est rapportée à la quantité de matière fraîche utilisée pour la préparation de l'extrait.

IV]-9 EVALUATION DE L'OXYDATION DES LIPIDES PAR LA METHODE THIOBARBITURIC ACID-REACTIVE-SUBSTANCES (TBARS)

Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit secondaire de l'oxydation des acides gras polyinsaturés et une technique couramment utilisée depuis les années 50 pour doser le MDA se base sur l'usage d'acide thiobarbiturique (TBA) ; on parle de *thiobarbituric acid-reactive-substances* (TBARS) assay. Le MDA se forme par auto-oxydation et par dégradation enzymatique des acides gras insaturés dans la cellule. Le principe de la méthode TBARS repose sur la réaction du MDA et du TBA incubés ensemble à 95°C en présence d'hydroxytoluène butylé (BHT, qui prévient la suroxydation du mélange). La réaction aboutit à un complexe de couleur rose/rouge dont on peut mesurer l'absorbance à 532 nm. Cependant de nombreuses plantes présentent des composés qui interfèrent avec les mesures d'absorbances (A_{532} nm), ce qui a pour conséquence une surestimation des teneurs en MDA. Il est possible de corriger ce biais en soustrayant l'absorbance mesurée à 532 nm d'un extrait incubé sans TBA, à l'absorbance d'un même extrait auquel du TBA a été ajouté. Afin de tenir compte des interférences imputables aux sucres, il est également recommandé de mesurer et de soustraire l'absorbance maximale due aux saccharoses, glucose et fructose mesuré à 440 nm, à l'absorbance de l'échantillon lue à 532 nm.

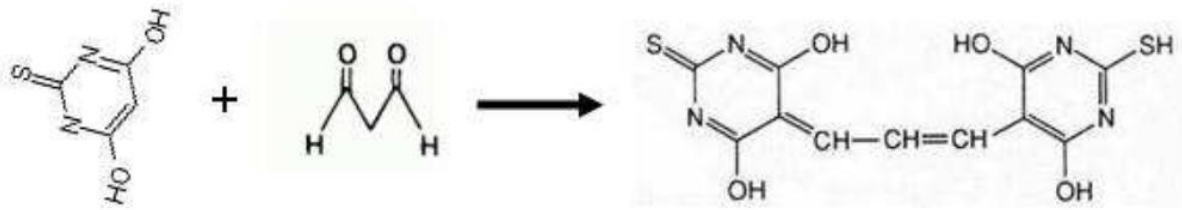


Figure 15 : Réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (d'après Pourrut et al., 2008)

Mesures

L'extraction des lipides se fait en homogénéisant une masse donnée de matière fraîche dans 25 fois cette masse d'éthanol à 80 %. Le mélange est centrifugé à $3000 \times g$ à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant constitue l'extrait lipidique. Un volume d'extrait est mélangé avec un volume de solution d'acide thiobarbiturique (TBA 0.65% (m/v), TCA 20% (m/v), BHT 0.01% (m/v)). Un autre volume d'extrait est mélangé avec un volume de solution sans TBA (TCA 20% (m/v), BHT 0.01% (m/v)). Les deux mélanges sont placés au bain marie à 95°C pendant 25 minutes. La lecture des absorbances se fait au spectrophotomètre (*Shimadzu CPS-240A*) à 532 nm, 440 nm et 600 nm.

Ces valeurs d'absorbance sont traitées pour obtenir la valeur en MDA équivalent en nmol de TBARS par mg de matière fraîche au moyen des équations de Hodges et al. (1999) :

- $[A_{532} (\text{avec TBA}) - A_{600} (\text{avec TBA})] - [A_{532} (\text{sans TBA}) - A_{600} (\text{sans TBA})] = A$
- $[A_{440} (\text{avec TBA}) - A_{600} (\text{avec TBA})] \times 0,0571 = B$
- $\text{MDA équivalents (nmol.ml}^{-1}\text{)} = [(A - B) / 157\,000] \times 10^6$

Pour rapporter les équivalents MDA à la masse de matière fraîche, on divise la valeur obtenue d'après les équations par la masse de matière fraîche utilisée pour préparer l'extrait lipidique.

IV]-10 EXTRACTION DES PROTEINES FOLIAIRES SOLUBLES ET DETERMINATION DU NIVEAU DE CARBONYLATION DES PROTEINES

IV]-10-1 EXTRACTION

Toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Environ 200 mg de feuilles préalablement broyées dans de l'azote liquide sont resuspendus dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5 (50 mM)). La suspension est ensuite homogénéisée au vortex. Afin d'éliminer les débris cellulaires, l'homogénat est centrifugé à 5000 x g pendant 5 minutes à 4°C. L'opération est répétée deux fois (un total de 3 centrifugations). Le surnageant récupéré constitue l'extrait protéique soluble.

IV]-10-2 DETERMINATION DU NIVEAU D'OXYDATION

(GROUPEMENT CARBONYLE) D'EXTRAITS PROTEIQUES FOLIAIRES

Principe

Le niveau d'oxydation des protéines foliaires a été déterminé par le biais du dosage des groupements carbonyle présents sur les protéines solubles des feuilles de maïs. Ces mesures ont été réalisées par immunodétermination après dérivation des extraits cellulaires au moyen de 2,4-dinitrophényldrazine (DNPH). Ce composé réagit avec les groupements carbonyle présents sur certains acides aminés suite à leur oxydation par les ROS et forme du 2-4-dinitrophenylhydrazone. Les extraits protéiques ainsi traités sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, et font l'objet d'une immuno-détection avec des anticorps anti-(2-4DNP). Les signaux obtenus par immuno-chimiluminescence sont quantifiés par densitométrie et sont normalisés à partir d'un signal de référence obtenu à partir d'un échantillon contrôle du prélèvement P2 et arbitrairement fixé à 1.

Mesures

Une solution mère de DNPH à 20 mM est préparée par resuspension de poudre de DNPH pur dans 1 volume d'acide trifluoroacétique pour 9 volumes d'eau ultra-pure. On prépare également une solution neutralisante de Tris 2 M dans du

glycérol à 30 % (m/v), à laquelle on ajoute extemporanément du β -mercaptoéthanol (28 μ L pour 164 μ L de solution neutralisante).

La dérivation des groupements carbonyle est réalisée dans un microtube (1,5 mL). 80 μ L d'extrait protéique contenant 100 μ g de protéine sont mélangés avec 100 μ L de DNPH (20 mM) et 20 μ L de sodium dodécylsulfate (SDS) (30 % m/v). Le mélange réactionnel est incubé 20 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout de 80 μ L de solution neutralisante.

IVJ-10-3 SEPARATION DES PROTEINES FOLIAIRES SOLUBLES PAR ELECTROPHORESE SUR GELS DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS DENATURANTES (SDS-PAGE)

28 μ L de mélange réactionnel décrit ci-dessus, soit 10 μ g de protéines dérivées au DNPH, sont séparées sur gel de polyacrylamide. Une tension de 150 V ainsi qu'une intensité maximale de 30 mA sont appliquées au système pendant la migration des protéines (système Bio-Rad MiniProtean, Tetracell, Bio-Rad Laboratories, France).

Pour chaque extrait le dépôt est dupliqué sur deux gels distincts. Après migration, le premier gel fera l'objet d'un transfert sur membrane, le second d'une coloration au bleu de Coomassie.

La composition des gels de concentrations et de séparation est respectivement 4 % et 12 % d'acrylamide / polyacrylamide (37.5/1). Ils sont respectivement préparés dans un tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS (0,1 % m/v) et un tampon Tris-HCl 1.5 M, pH 8,5, SDS (0,1 % m/v).

IVJ-10-4 TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE ET VISUALISATION DES PROTEINES OXYDEES PAR IMMUNOCHEMILUMINESCENCE

Après séparation des protéines, le transfert se fait sur membrane de nitrocellulose (Amersham Protran Premium 0.45 NC, GE Healthcare Life Sciences) dans un assemblage de papier Whatman™ (Gel Blotting-Papier, Whatman 3MM, Roth). Il est réalisé en condition semi-sèche (Trans-Blot® Turbo™ Transfert System,

Bio-Rad Laboratories, France). Le voltage est maintenu à 25 V pour une intensité maximale de 2,5 A pendant 15 minutes dans le tampon de transfert du kit Trans-Blot Turbo Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories, France) complété avec du SDS (0,2 % m/v final). La membrane est incubée toute la nuit sous agitation à 4°C dans un tampon TBS, Tween 0,2 % (V/V) complété avec 5 % (m/v) de caséine. L'anticorps primaire est dilué au 1 : 40 000° final dans un tampon TBS complété avec 0,5% (m/v) de caséine et mis au contact de la membrane pendant 3 h sous agitation à température ambiante ; l'anticorps secondaire est dilué au 1 : 80 000° final dans un tampon TBS complété avec 0,5% (m/v) de caséine et la membrane est incubée pendant 1 h sous agitation à température ambiante, avant révélation.

IV]-10-5 VISUALISATION DES PROTEINES OXYDEES APRES COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE ET ANALYSE PAR DENSITOMETRIE DES SIGNAUX ACQUIS

Les protéines du second gel sont colorées au bleu de Coomassie (éthanol 30 % (v/v), acide acétique 7 % (v/v), bleu de Coomassie 0,25 % (m/v)) pendant 24 heures puis décolorées toute la nuit dans le mélange décrit précédemment sans colorant. Les signaux persistant dans le gel décoloré sont enregistrés à l'aide d'un transilluminateur Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad Laboratories, France). L'image obtenue est ensuite analysée à l'aide du logiciel Image Lab version 4.1 (Bio-Rad Laboratories, France) par densitométrie après acquisition des signaux. Les analyses sont réalisées en utilisant la fonction « volume tool » du logiciel Image Lab™, selon les recommandations du fabricant.

IV]-11 DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES DE FEUILLES DE MAÏS

La teneur en protéines solubles de chaque échantillon est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

Les mélanges préparés sont composés de 40 µL d'extrait protéique soluble dilué au dixième avec de l'eau ultra pure, 760 µL d'eau ultra pure, 200 µL de bleu de Coomassie (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad). Le mélange de

témoin contient 800 μL d'eau ultra pure et 200 μL de bleu de Coomassie. Après homogénéisation et incubation pendant 15 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595 nm. Pour chaque extrait protéique, trois répétitions techniques sont effectuées. Une gamme étalon (1 μg à 20 μg) est réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) diluée dans le tampon d'extraction ayant servi à la préparation de l'extrait protéique concerné. La teneur en protéines solubles de chaque échantillon, exprimée en mg.mg^{-1} de masse foliaire fraîche, est obtenue en moyennant les valeurs obtenues avec les trois réplicats techniques.

IV]-12 ANALYSES STATISTIQUES

L'ensemble des analyses statistique a été réalisée au moyen du logiciel R.

Pour les mesures effectuées sur les échantillons issus des récoltes R1 et R2, l'évaluation de l'effet du traitement à l'ozone est réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) avec le traitement à l'ozone comme facteur, suivi d'un test *post hoc* de Tukey.

Pour les paramètres mesurés sur les prélèvements P1 à P4, les analyses statistiques ont été réalisées en deux temps : Une première analyse statistique est menée en comparant l'ensemble du jeu de données et une comparaison entre l'effet de l'âge des plantes et du traitement à l'ozone est réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs, avec l'âge et le traitement à l'ozone comme facteurs, suivi d'un test *post hoc* de Tukey. Une seconde analyse est ensuite menée sur chaque date de prélèvement individuellement afin de se concentrer sur l'effet potentiel de l'ozone. Celui-ci est analyse par ANOVA et suivi d'un test *post hoc* de Tukey.

La relation entre deux variables est testée par régression linéaire. La significativité entre la variable dépendante et la variable explicative est déterminée par ANOVA, en utilisant la loi de Fisher-Snedecor.

IV] RESULTATS

V]-1 EXPOSITION A L'OZONE

V]-1-1 FREQUENCE HORAIRE DES NIVEAUX D'OZONE

Les fréquences horaires des niveaux d'ozone ont été calculées pendant la période de fumigation, lorsque le rayonnement globale était supérieur à 50 W.m^{-2} ([Fig.17-A](#)), c'est-à-dire quand les conditions environnementales sont propices à l'augmentation des concentrations d'ozone ambiant. Sur le total de 739 heures d'enregistrement pendant l'expérimentation, la durée totale de la fumigation s'élève à environ 296 heures. Selon leur position par rapport à la source d'ozone, les plants de maïs à 2m ont été soumis à des concentrations d'ozone supérieures à 40 ppb pendant 53 % du temps de fumigation, contre 25,7 % pour les plants témoins. Les concentrations d'ozone les plus élevées ont rarement dépassé 200 ppb pour les plants de maïs sous le panache de la rampe de fumigation.

Les moyennes des concentrations journalières sont basées sur les moyennes horaires en ozone calculées pour l'ensemble de la période de fumigation et représentée en fonction de la distance à la rampe de fumigation ([Fig.17-B](#)). Comme attendu, les concentrations journalières en ozone sont plus élevées à 2 m qu'à 3,5 m de la source d'ozone et sont systématiquement supérieures aux concentrations ambiantes d'ozone. Quelle que soit la distance à la source d'ozone, les variations journalières des concentrations au cours sont similaires : elles augmentent rapidement de 8h à 11h, puis continuent à augmenter plus lentement jusqu'à 19h environ, heure à laquelle elles chutent assez brutalement.

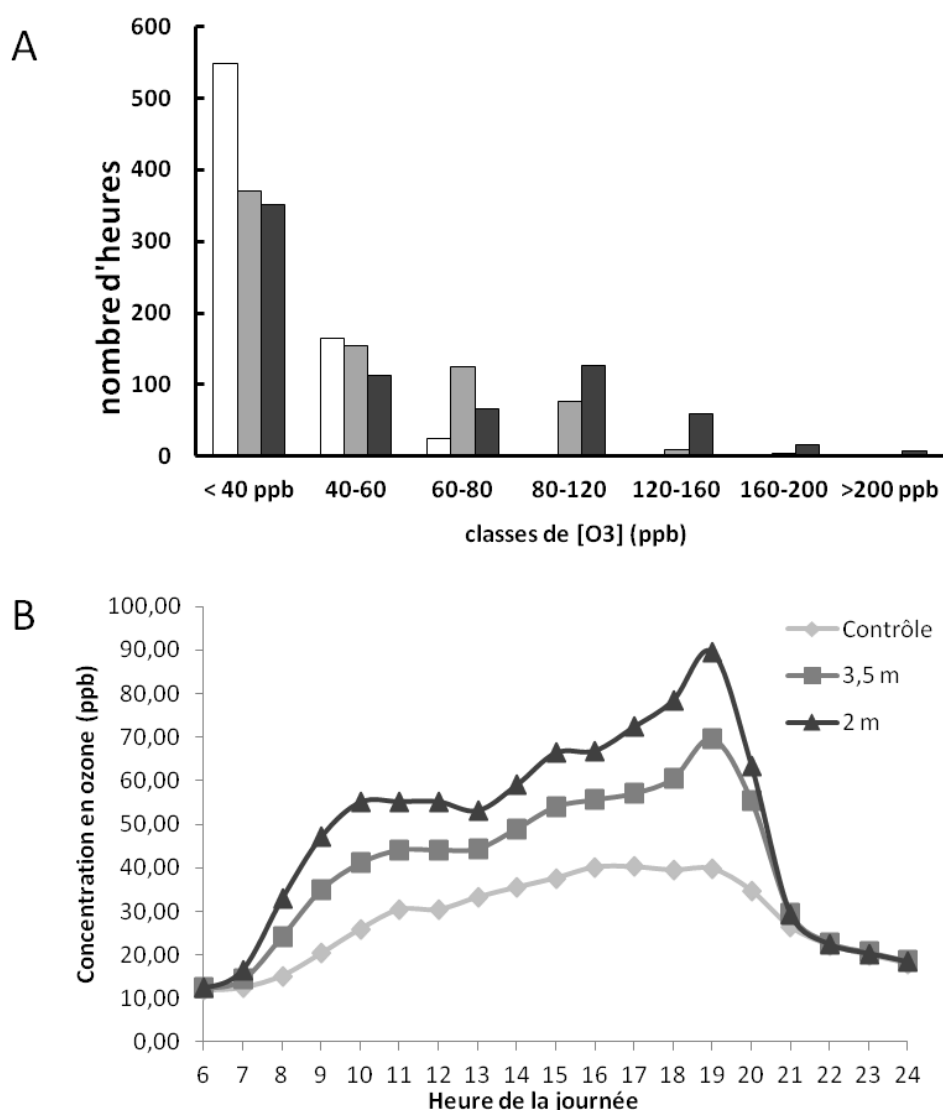


Figure 16 : A : Fréquence horaire des niveaux d'ozone pour chaque traitement.
B : Exposition journalière moyenne en ozone.

V]-1-2 VARIATIONS DES VALEURS D'AOT40

Durant la période de fumigation, les plants contrôle, cultivés à 15 m de la source d'ozone, ont été exposés à un AOT40 de 2,40 ppm.h (Fig.18). Durant cette même période, les plants situés à 3,5 m et 2 m, ont été respectivement exposés à des AOT40 de 14,93 ppm.h (+622 % d'ozone) et 24,30 ppm.h (+1013% d'ozone) (Tableau.4). La progression de l'indice AOT40 n'est pas régulière dans le temps ; ces variations sont imputables aux fluctuations des conditions climatiques qui déclenche (ou non) le système de génération et diffusion de l'ozone. La période de fumigation

se terminant au jour julien 243, l'indice AOT40 n'augmente guère au-delà de cette période.

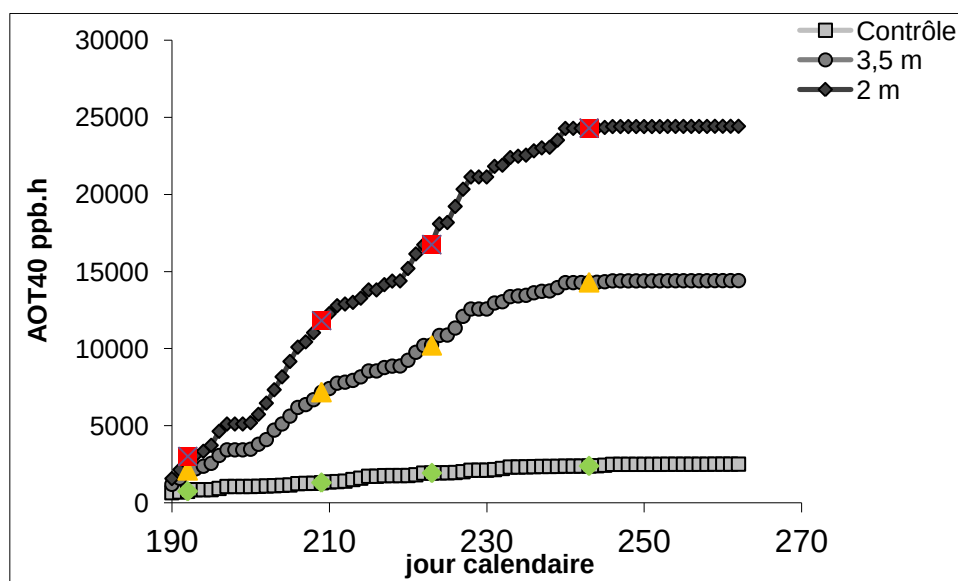


Figure 17 : Cumul d'AOT40 au cours de la période de fumigation en fonction du traitement considéré. Les points colorés indiquent les dates de prélèvements. Les mesures des conditions 3,5 m et 2 m ont été effectuées en aval de la source d'ozone, les mesures de la condition contrôle ont été effectuées 15 m en amont de la source d'ozone.

Tableau 4 : Valeurs d'AOT40 calculées à chaque date de prélèvement

	Date	Jours Julien	Durée de fumigation (jours) à la date de prélèvement	Numéro de prélèvement	AOT 40 à la date de prélèvement au point de prélèvement considéré		
					Contrôle	3,5 m	2m
Début de la fumigation	02-juil-2011	183	0	-	0	0	0
Prélèvements des feuilles de l'épi	11-juil-2011	192	9	P1	750	2110	3010
	28-juil-2011	209	26	P2	1312	7177	11823
	11-août-2011	223	40	P3	1943	10250	16843
	31 août 2011	243	60	P4	2399	14927	24300

V]-2 PARAMETRES DE RENDEMENT

Les différents paramètres de rendement ont été analysés après récolte des parties aériennes des plants situés à 2 m et 3,5 m de la source d'ozone en aval des vents dominants, ainsi que chez les plants contrôles situés à 15 m de la rampe en amont des vents dominants. Les échantillons sont issus de deux campagnes de récolte de plants matures, ayant eu lieu le 05 septembre 2011 et le 03 octobre 2011.

V]-2-1 POIDS DE 1000 GRAINS

Le poids de 1000 grains (PMG) est en moyenne de 321 g, tous traitements et toutes récoltes confondus ([Fig.19](#)). Pour chaque traitement, le PMG augmente en moyenne de 3 % entre la récolte 1 et la récolte 2. L'augmentation n'est cependant pas significative ($p>0,05$). De plus, les traitements appliqués n'ont pas d'effet significatif sur le PMG, les plants de maïs exposés à l'ozone présentant des valeurs de PMG équivalentes à celles des maïs contrôles ($p>0,05$).

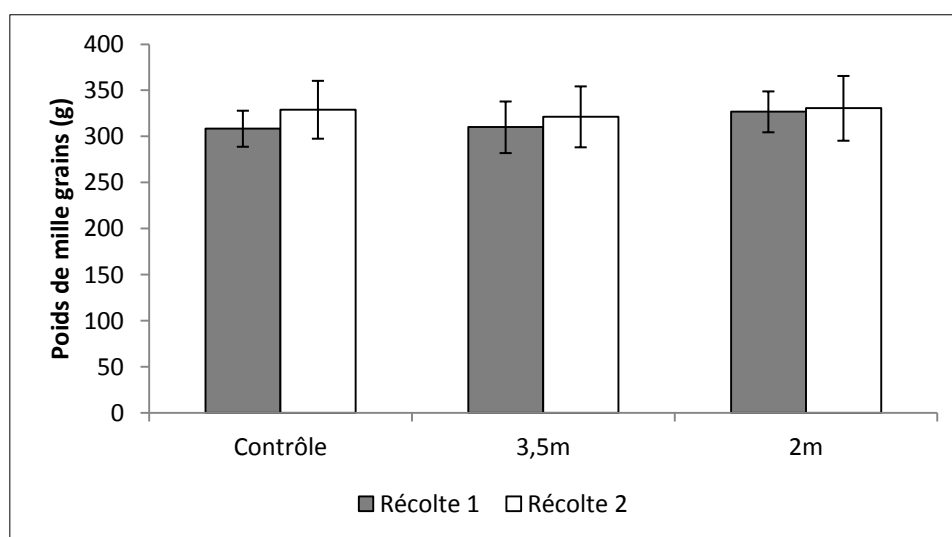


Figure 18 : Poids de mille grains mesurés sur des plants de maïs (*Zea mays* L., cv NK Perform) cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=10$. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-2 TENEUR EN AMIDON DANS LES CARYOPSES

Les caryopses de maïs présentent une teneur moyenne en amidon de 65 % (Fig.20). Les traitements à l'ozone n'ont pas d'effet significatif sur cette valeur ($p>0,05$). De plus, aucune différence n'est observée entre les deux récoltes ($p\geq 0,05$).

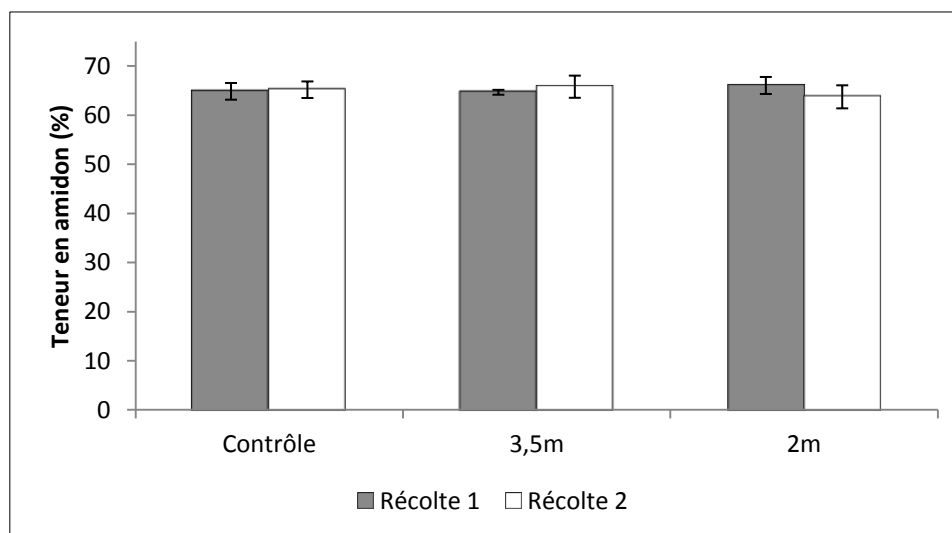


Figure 19 : Pourcentage d'amidon dans les caryopses récoltés sur des plants de maïs (*Zea mays* L., cv NK Perform) cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=10$. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-3 DETERMINATION DU NOMBRE DE RANGS PAR EPI ET DU NOMBRE DE GRAINS PAR RANG

Les traitements à l'ozone n'ont d'influence significative ($p>0,05$) ni sur le nombre de rangs par épi récolté (13 rangs par épi en moyenne), ni sur le nombre de grains par rang (31 grains par rang en moyenne) (Fig.21). De plus, des valeurs équivalentes sont obtenues pour les deux récoltes ($p>0,05$).

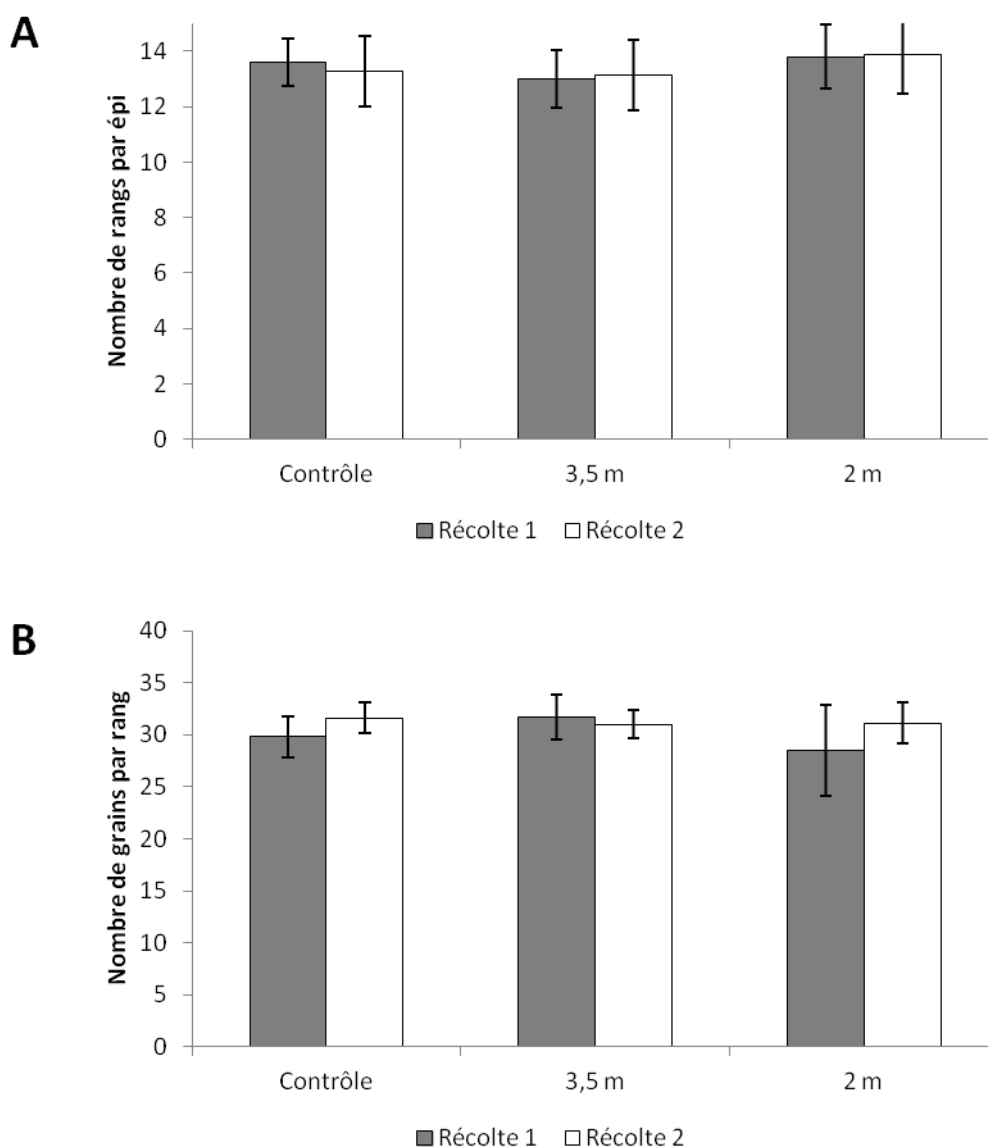


Figure 20 : A : Nombre de rang par épi observés sur des épis de plants de maïs (*Zea mays* L., cv NK Perform) cultivés en atmosphère ambiante ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=10$. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$. B : Nombre de grains par rang. Les valeurs pour la Récolte 1 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=10$. Les valeurs pour la Récolte 2 représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-4 RAPPORT C/N DANS LES FEUILLES, LES TIGES (ET LES CARYOPSES)

Globalement, les teneurs en azote dans les tiges des plants de maïs matures varient entre $3,89 \pm 0,22$ et $4,87 \pm 0,62 \text{ g.kg}^{-1}$ pour la récolte R1, et entre $4,21 \pm 0,35$

et $4,99 \pm 0,96 \text{ g.kg}^{-1}$ pour la récolte R2. Les teneurs en C sont extrêmement stables, elles sont de l'ordre de $377,71 \pm 20,82 \text{ g.kg}^{-1}$ pour R1 et de $340,35 \pm 32,51 \text{ g.kg}^{-1}$ pour R2 ([Fig.22](#) et [fig.23](#)) Au moment de la récolte 1 (05/09/2011), les traitements à l'ozone n'avait pas eu d'effet significatif sur les teneurs en C ($p>0,05$) ([Fig.22](#)). En revanche, les teneurs en azote sont significativement plus élevées chez les plants cultivés à 2 mètres de la source d'ozone que chez les plants contrôles ($p<0,05$). Le rapport C/N est quant à lui significativement plus élevé chez les plants contrôles que chez les plants cultivés à 2 m de la rampe de fumigation –(e.g de la source d'ozone) ($p<0,05$) ([Fig.22](#)).

A la récolte 2 (03/10/2011), les tiges des plants maïs présentent des teneurs en carbone et des rapports C/N équivalents ($p>0,05$), quel que soit le traitement à l'ozone appliqué. Comme pour la récolte 1, les teneurs en azote sont significativement plus élevées chez les plants cultivés à 2 m de la rampe de fumigation que chez les plants contrôles ($p<0,05$) ([fig.23](#)).

Il faut noter que les teneurs en azote dans les tiges n'ont pas varié significativement entre les deux récoltes. En revanche, on a mesuré significativement moins de C dans les tiges à la récolte 2 qu'à la récolte 1 ($p<0,05$). Par conséquent, les rapports C/N à la récolte 1 sont significativement ($p<0,05$) supérieurs à ceux de la récolte 2.

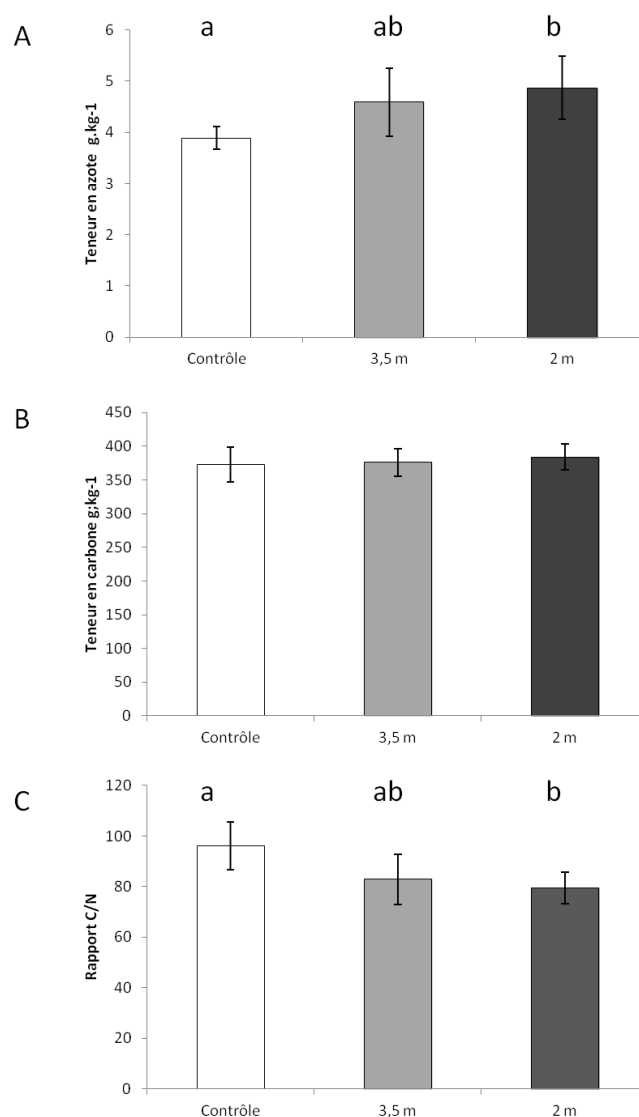


Figure 21 : Teneurs en azote et en carbone dans les tiges des plants de maïs pour la récolte R1(05/09/2011).. (A) : azote (en g.kg⁻¹), avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA $p < 0,05$). (B) : carbone (en g.kg⁻¹). (C) : rapport C/N, avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA $p < 0,05$). Les valeurs des différents graphes représentent les moyennes $\pm$ ET avec $n=5$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

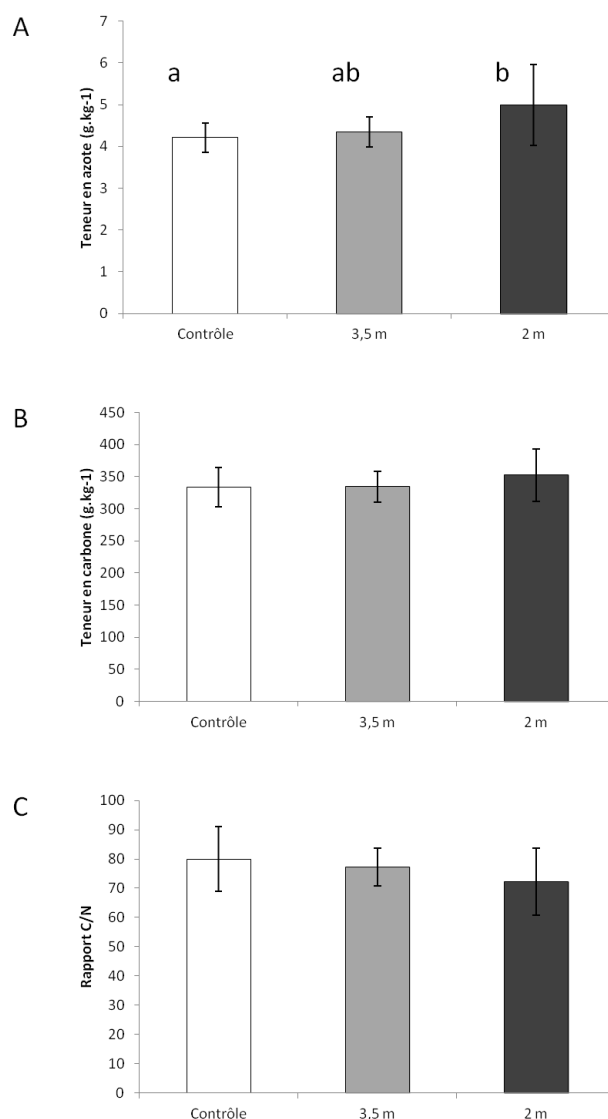


Figure 22 : Teneurs en azote et en carbone dans les tiges des plants de maïs pour la récolte R2 (03/10/2011).. (A) : azote (en g.kg-1), avec la condition contrôle significativement différente de la condition 2 m (ANOVA $p < 0,05$). (B) : carbone (en g.kg-1). (C) : rapport C/N. Les valeurs des différents graphes représentent les moyennes $\pm$ ET avec $n=5$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-5 QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE AERIENNE

Les valeurs de biomasse aérienne ont été mesurées sur des plants de maïs récoltés le 03 octobre 2011 (R2). Les différents traitements à l'ozone n'ont d'effet significatif ($p > 0,05$) ni sur la quantité de biomasse aérienne fraîche, ni sur la quantité de biomasse aérienne sèche ($p > 0,05$) produites par les plants de maïs ([Fig.24](#)).

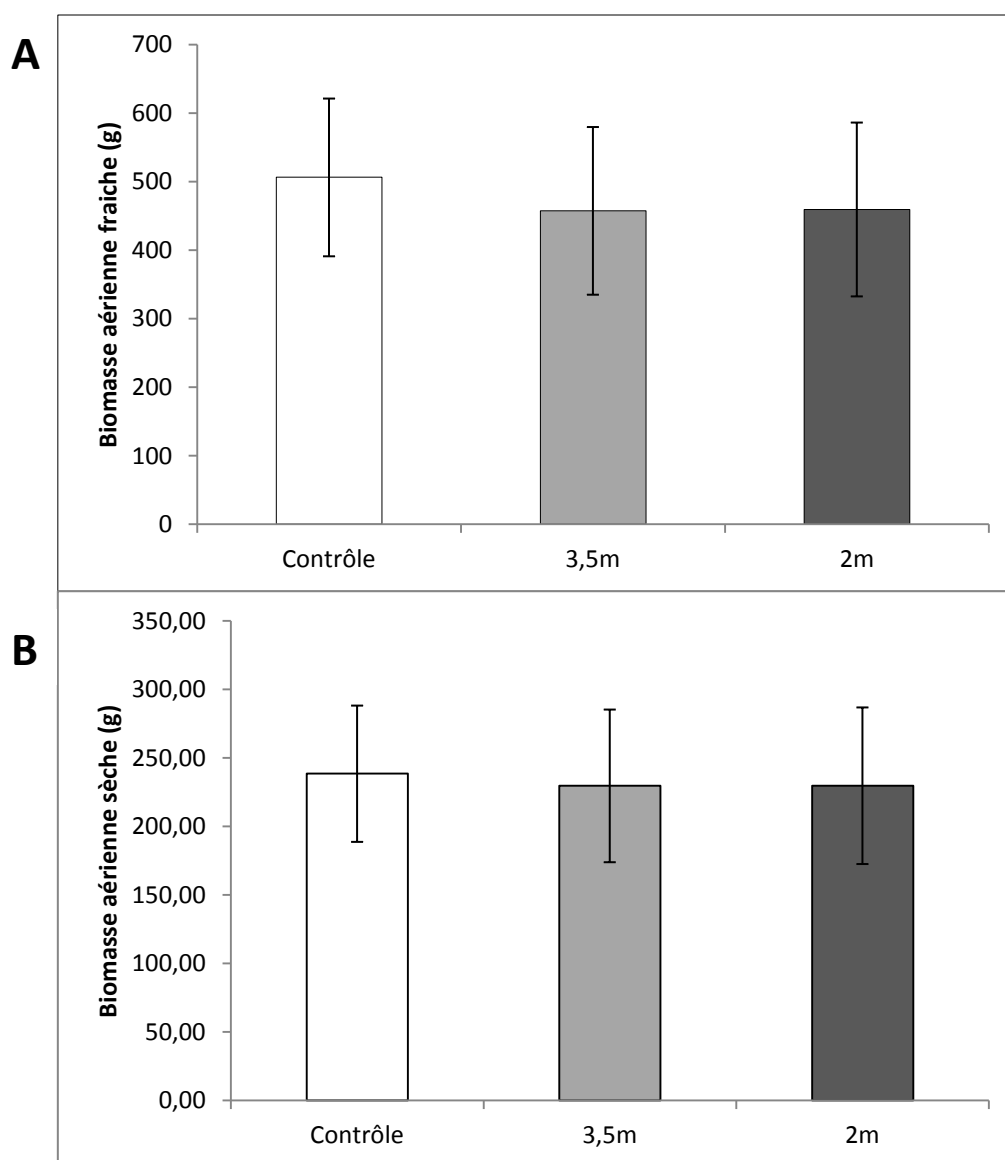


Figure 23: Biomasses aériennes fraîche (A) et sèche (B) produites par des plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs pour la biomasse aérienne fraîche représente la moyenne $\pm$ ET avec $n=64$ pour les plants contrôles et les plants à 3,5m, $n=63$ pour les plants à 2m. Les valeurs pour la biomasse aérienne sèche représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=48$ pour les plants contrôle et les plants 3,5 m, $n= 47$ pour les plants à 2 m. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-6 INDICE DE RECOLTE

L'indice de récolte ne varie pas significativement entre les plants de maïs surexposés à l'ozone et les témoins ($p>0,05$). Les valeurs oscillent entre 0,493 et 0,502 ([Fig.24](#))

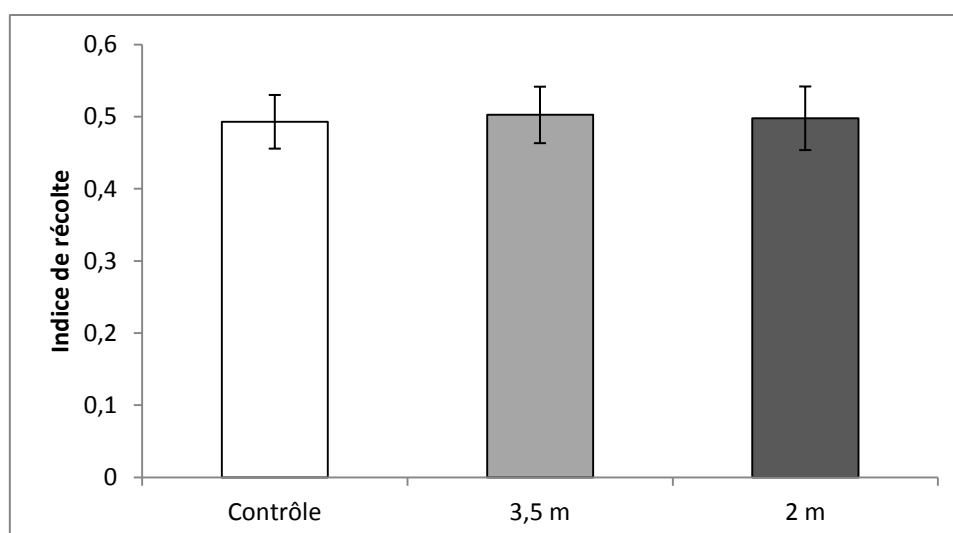


Figure 24 : Indices de récolte déterminés sur des plants de maïs cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=48$ pour les plants contrôles et les plants à 3,5m ; $n=47$ pour les plants à 2m. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-7 SURFACES FOLIAIRES

A la date de la récolte des épis (R2, 03/10/2011), les plants de maïs présentent des surfaces foliaires totales moyennes allant de $483 \pm 34,24 \text{ cm}^2$ à $581,21 \pm 57,31 \text{ cm}^2$ (Fig.25). Les différents traitements à l'ozone imposés n'ont pas d'effet significatif ($p < 0,05$) sur ce paramètre.

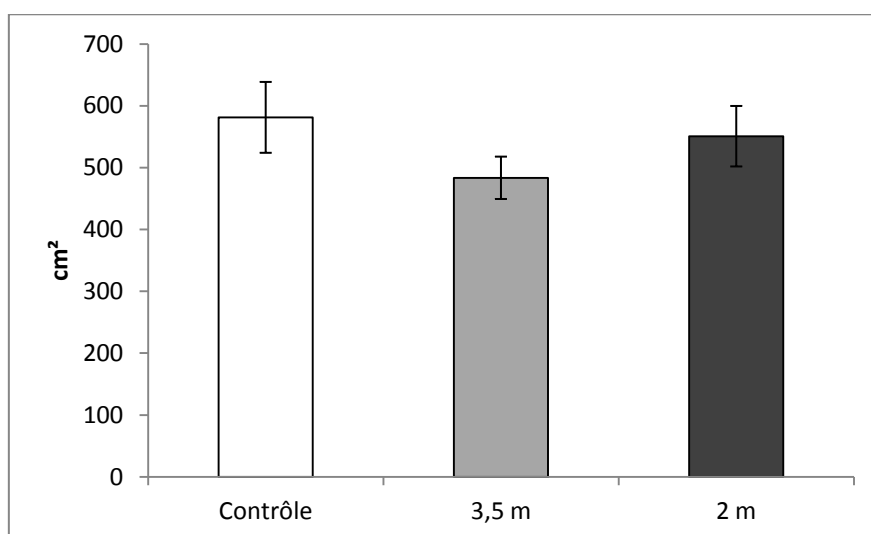


Figure 25 : Surface foliaire de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$ (Contrôle, 2 m) et $n=15$ (3,5 m). Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-8 MASSES SURFACIQUES

A la date de la récolte des épis (R2, 03/10/2011), les feuilles des plants de maïs présentent des masses surfaciques moyennes allant de $6,24 \pm 0,56 \text{ mg.cm}^{-2}$ à $6,51 \pm 0,69 \text{ cm}^{-2}$ (Fig.26). Les différents traitements à l'ozone imposés n'ont pas d'effet significatif ($p < 0,05$) sur ce paramètre.

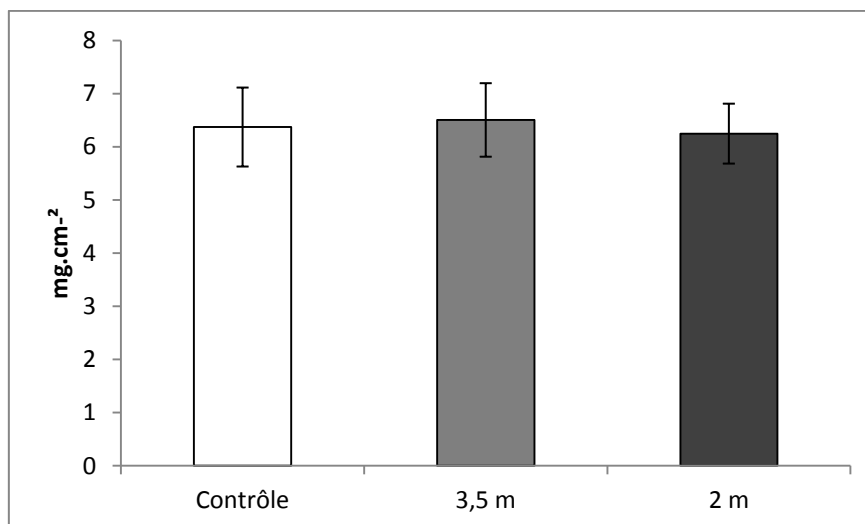


Figure 26 : Surface foliaire de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=16$ (Contrôle, 2 m) et $n=15$ (3,5 m). Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-2-9 POURCENTAGE DE GERMINATION

Le pourcentage de germination des semences récoltées sur les plants de maïs traités n'est pas affecté par l'ozone (Fig.27). Quel que soit le traitement appliqué, les pourcentages de germination obtenus sont compris entre 97 % et 100%, 60h après le début de l'imbibition.

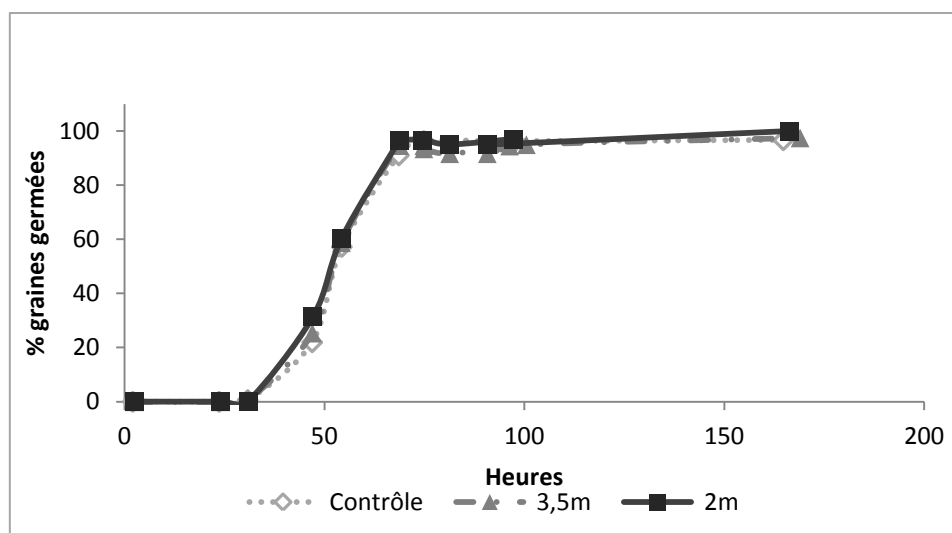


Figure 27 : Pourcentage de germination de semences récoltées sur des plants de maïs cultivés en air ambiant ou enrichi en ozone. Les valeurs représentent le nombre de semences ayant germé à différents intervalles de temps, avec $n=16$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h sur une durée de 60 jours.

V]-3 PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES

V]-3-1 CONDUCTANCE STOMATIQUE ET ASSIMILATION NETTE

L'évolution des valeurs d'assimilation nette (A_n) a été suivie régulièrement au cours de la période de fumigation sur les feuilles de l'épi ([Fig.28-A](#)). Pour les plants contrôles, l' A_n varie entre $8,38 \pm 1,26 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ et $15,07 \pm 1,21 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Pour les plants surexposés à l'ozone, les valeurs d' A_n sont comprises entre $4,14 \pm 0,54 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ et $8,07 \pm 1,67 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$.

L'analyse statistique de l'ensemble du jeu de données indique un effet significatif ($p < 0,05$) du traitement et de la période de mesure. Dans le cas de l'effet du traitement cela se traduit par des différences significatives entre plants contrôles et plants surexposés à l'ozone (3,5 m et 2 m). Pour l'effet de la période de mesure, cela se traduit par des différences significatives entre la période (en JJ) 225-235 et les périodes 200-210 et 235-245 ($p < 0,05$).

De plus, une analyse statistique centrée sur les données obtenues aux différentes périodes de mesure indique un effet significatif des traitements appliqués aux plants pour les périodes (en JJ), 215-225 ; 225-235 et 235-245. Des analyses *post hoc* menées sur chacune de ces périodes indiquent : pour la période 215-225 une différence significative entre plants contrôles et plants surexposés à l'ozone à 2

m ($p < 0,05$) ; pour les périodes 225-235 et 235-345 les différences significatives se situent entre les plants contrôles et les plants exposés à l'ozone (2 m et 3,5 m).

L'évolution des conductances stomatiques des feuilles de l'épi a été suivie au cours de la période de fumigation ([Fig.28-B](#)). Globalement, les valeurs de conductance se situent entre $142,48 \pm 10,22 \text{ mmol.m}^2.\text{s}^{-1}$ et $254,45 \pm 58,49 \text{ mmol.m}^2.\text{s}^{-1}$, tous traitements confondus.

L'analyse statistique menée sur l'ensemble du jeu de données montre que la g_s est significativement affectée par la période durant laquelle les mesures ont été réalisées ($p < 0,05$) mais pas par les traitements appliqués ($p > 0,05$). L'effet de la période de mesure se traduit par des valeurs de g_s significativement plus hautes pour la période 235-245 (JJ) que pour la période 200-210 (JJ).

De plus, l'analyse statistique centrée sur les données obtenues aux différentes périodes de mesure indique que le traitement n'a un effet significatif que pour la période de mesure 235 à 245 (JJ) ($p < 0,05$). L'analyse *post hoc* indique que les plants contrôles présentent des conductances stomatiques significativement plus élevées que les plants surexposés à l'ozone ($p < 0,05$) ([Fig.28-B](#)).

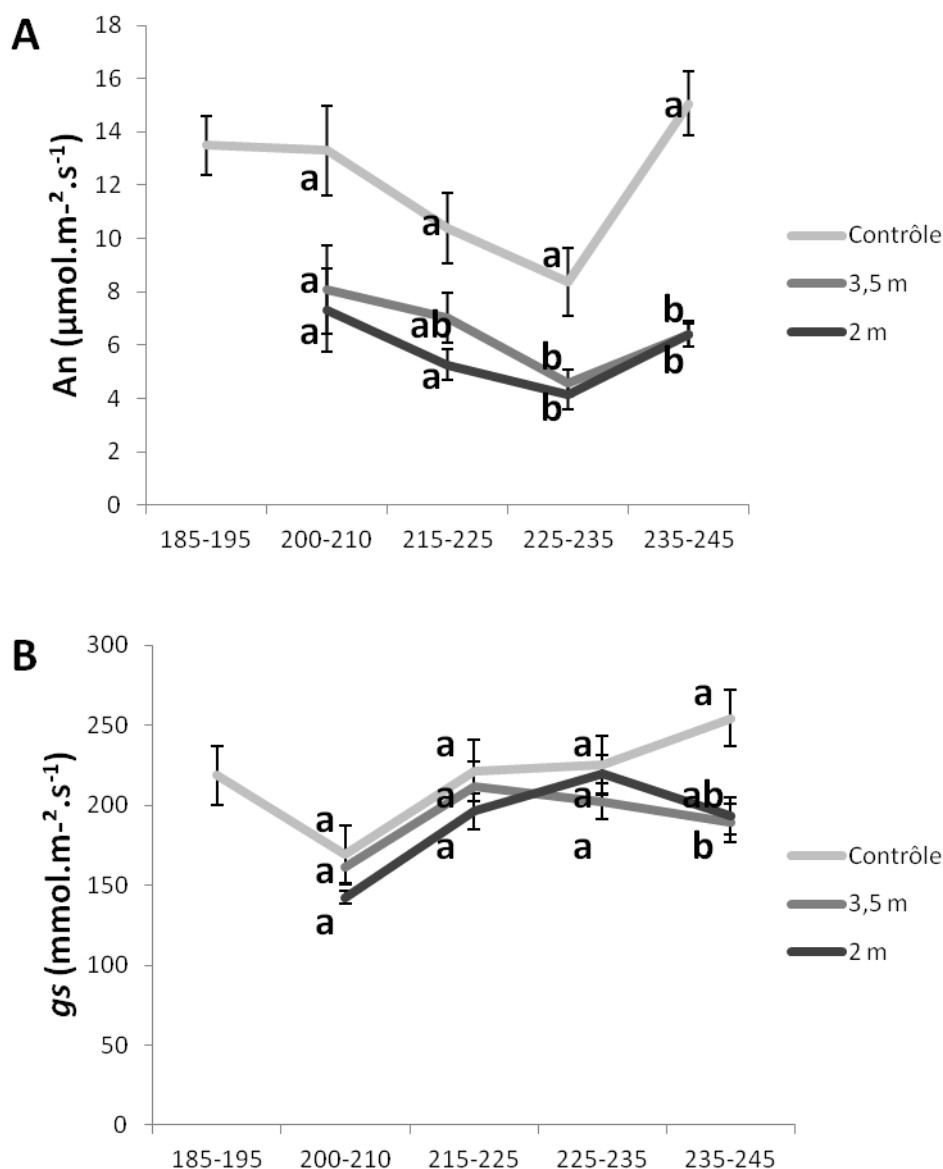


Figure 28 : A : Assimilation nette (An en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone. Les moyennes sont établies sur des périodes de 10 jours (incluant les dates des prélèvements P1-P4), les barres d'erreurs représentent les erreurs standards et $n \geq 6$. B : Conductance stomatique (gs en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) du même matériel végétal que A. Les valeurs présentées sont des moyennes de mesures étalées sur 10 jours, les barres d'erreurs représentent les erreurs standards et $n \geq 6$. Les traitements Contrôle, 3,5 m et 2 m, correspondent à des plantes respectivement exposées, au JJ 243, à des AOT40 de 2,40 ; 14,93 ; 24,30 ppm.h.

VJ-3-2 TENEUR EN PROTEINES SOLUBLES TOTALES DANS LES FEUILLES

Les teneurs en protéines totales solubles dans les feuilles de l'épi des plants de maïs varient entre $12,85 \pm 2,34 \mu\text{g.mg}^{-1}$ MF au début de l'expérience et $6,03 \pm 3,64 \mu\text{g.mg}^{-1}$ MF, 60 jours plus tard, tous traitements confondus ([Fig.29](#)).

Si l'on considère l'ensemble des données, l'analyse statistique ne révèle pas d'interdépendance des effets de la date de prélèvement et des traitements ($p < 0,05$). Cependant des effets significatifs ($p < 0,05$) de la date de prélèvement et des traitements appliqués sont observés, sur la teneur en protéine foliaires solubles. Pour l'effet associé au prélèvement, cela se traduit par une différence significative des teneurs en protéines solubles des échantillons du prélèvement P4 par rapport aux autres ($p < 0,05$). Pour ce qui est de l'effet associé aux conditions d'exposition, cela se traduit par une différence significative des teneurs en protéines solubles, des échantillons des conditions contrôle et 2 m ($p < 0,05$).

Lorsque l'on considère chaque date de prélèvement indépendamment, l'analyse statistique révèle un effet significatif des traitements uniquement pour P4, toutefois une analyse *post hoc* n'indique pas de différences significatives entre les traitements ($p > 0,05$).

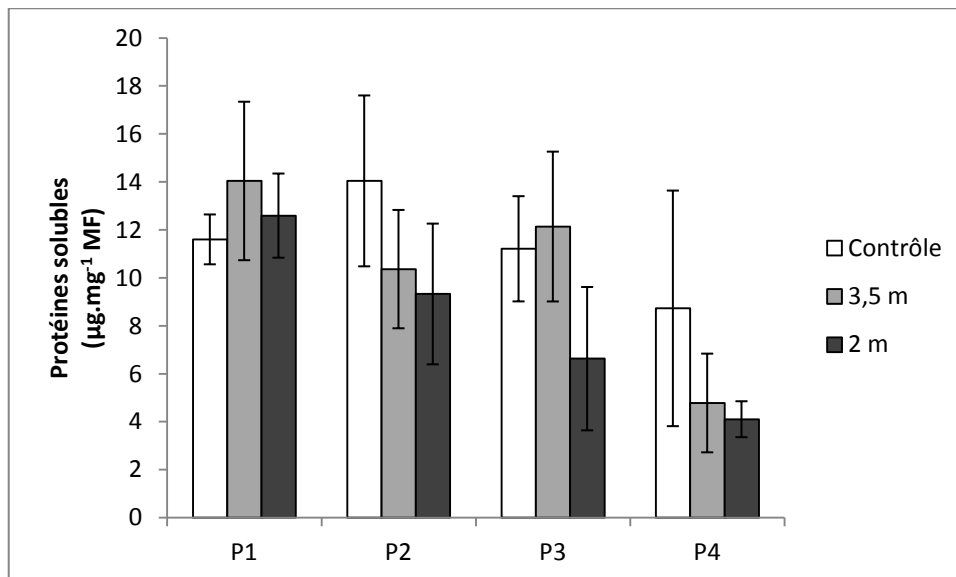


Figure 29 : Teneurs en protéine solubles totales ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MF) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à différentes concentrations d'ozone. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ET, avec $n \geq 3$ P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-3-3 TENEURS EN CHLOROPHYLLES TOTALES

Les feuilles de l'épi des plants de maïs contiennent en moyenne $49,83 \pm 3,45$ μg de chlorophylles par cm^{-2} de surface foliaire (Fig.30).

L'analyse statistique menée sur l'ensemble du jeu de donnée indique que teneur moyenne en chlorophylles totales n'évolue pas significativement aux cours de l'expérimentation ($p < 0,05$). En revanche, cette même analyse statistique montre que les plants cultivés à 2 m de la source d'ozone présentent globalement des teneurs en chlorophylles significativement inférieures à celles des contrôles ($p < 0,05$).

Lorsque les données sont analysées séparément, pour chaque date de prélèvement, une différence significative ($p < 0,05$) induite par les traitements est observée en fin d'expérimentation (P4) : à cette date, les plants 2 m présentent des teneurs en chlorophylles significativement plus faibles que celles des plants 3,5 m.

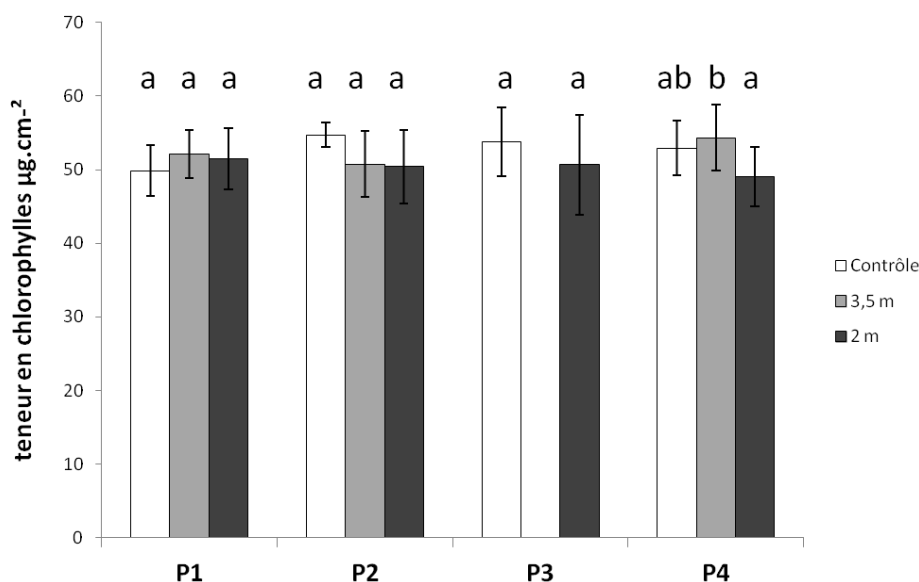


Figure 30 : Teneurs en chlorophylles totales ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à différentes concentrations d'ozone. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ET, avec $n=10$, sauf pour les échantillons du prélèvement P3 à 3,5 m, dont les données sont manquantes. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-4 EFFET DE L'OZONE SUR LES ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUE

V]-4-1 DETERMINATION DU PH OPTIMAL POUR LES MESURES D'ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUE TOTALE

L'hydrolyse d'un substrat de type caséine-Bodipy a été mesurée dans des extraits protéiques foliaires de maïs, sur une gamme de pH s'étalant de 5 à 9, dans l'objectif de déterminer le pH optimal pour les mesures de l'activité protéolytique totale. Les extraits ont été préparés à partir de feuilles de plants contrôles et soumis au traitement à l'ozone le plus sévère (2 m de la source). Les résultats indiquent clairement, pour les deux extraits, un pic d'activité unique aux alentours de pH 6 ([Fig.31](#)). Ainsi, cette valeur de pH a-t-elle été retenue pour l'ajustement des milieux réactionnels employés pour suivre les variations des activités protéolytiques foliaires en réponse aux traitements à l'ozone.

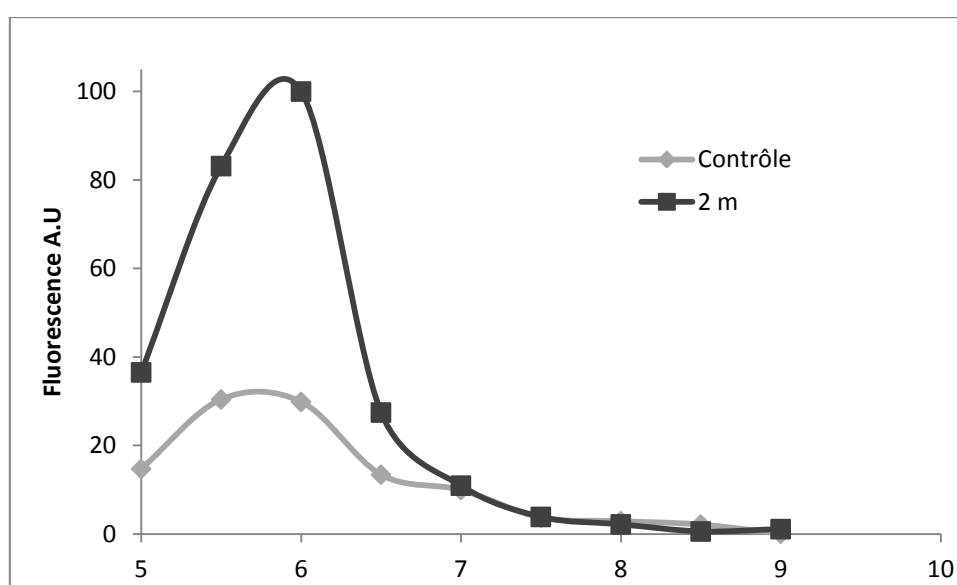


Figure 31: Activités endoprotéolytiques totales mesurées à différents pH réactionnels dans des extraits protéiques préparés à partir de feuilles de l'épi de plants de maïs exposés à un air enrichi en ozone (2 m) et à l'air ambiant (Contrôle). Les valeurs correspondant aux signaux de fluorescence (en unité arbitraire U.A) faisant suite à la dégradation du substrat BODIPY-Caséine.

V]-4-2 ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUES TOTALES

L'évolution des activités endoprotéolytiques totales dans les feuilles de l'épi a été suivie pendant la période de fumigation à l'ozone ([Fig.32](#)). Tous traitements confondus, ces activités sont faibles et constantes pendant la majeure partie de la période de fumigation et augmentent nettement, à la fin de la période de fumigation (P4). Une analyse statistique sur l'ensemble du jeu de donnée indique que cette augmentation est significative ($p < 0,05$). De plus cette augmentation est particulièrement marquée pour les plants à 2 m qui présentent une activité

protéolytique totale moyenne significativement supérieure à toutes les autres. Contrairement à ce qui est établi pour les teneurs en protéines foliaires, les traitements à l'ozone n'influencent pas les activités protéolytiques de manière significative. En revanche, un effet croisé significatif existe entre la date de prélèvement et les traitements à l'ozone ($p < 0,05$).

Lorsque les données d'activités endoprotéolytiques obtenues aux différentes dates de prélèvement sont traitées de manière indépendante, les analyses statistiques concluent encore une fois à l'absence d'effet significatif des traitements à l'ozone ($p > 0,05$). Ceci s'applique aussi à la date P4 à laquelle on relève toutefois une nette tendance à l'augmentation de ces activités en réponse à l'ozone (+118 % entre 3,5 m et 2 m ; +318 % entre les plants contrôles et 2 m). Il est à noter que le jeu de données P4 se caractérise par une forte variabilité des valeurs d'activités obtenues pour une même condition, ce qui se reflète dans la valeur des erreurs standard.

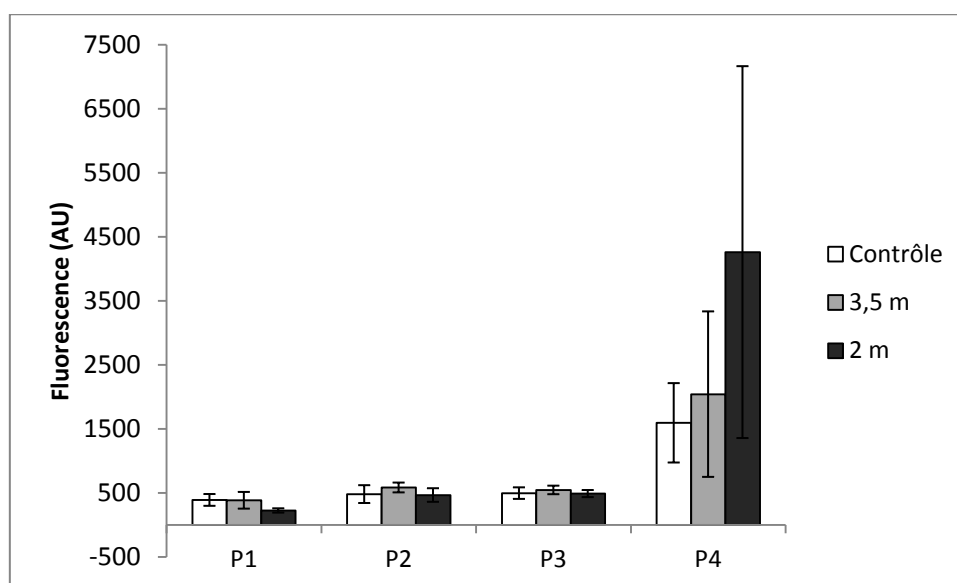


Figure 32 : Variations des activités endoprotéolytiques totales dans les feuilles de plants de maïs pendant la période de fumigation à l'ozone. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ES avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-4-3 ACTIVITES PROTEOLYTIQUES SPECIFIQUES

La contribution de deux classes d'endoprotéases (les protéases à cystéine et les protéases à sérine) à l'activité endoprotéolytique totale dans les extraits protéiques de feuilles de maïs a été établie au moyen de d'inhibiteurs spécifiques de chacune de ces classes (E64 pour les protéases à cystéine, Péfabloc pour les protéases à sérine) ([Fig.33-A-B](#)). Pour la majorité des extraits protéiques analysés, la somme des pourcentages d'inhibition des deux classes de protéases considérées dépasse 100 %. C'est un phénomène connu et dû à l'imparfaite spécificité des inhibiteurs.

En ce qui concerne la part de l'activité endoprotéolytique totale dans les feuilles de maïs imputable aux protéases à cystéine, l'analyse statistique menée sur l'ensemble des données révèle des effets significatifs des traitements et des dates de prélèvement ($p < 0.05$) sans toutefois faire ressortir d'effets croisés de ces deux facteurs. Pour ce qui est de l'effet des traitements, cela se traduit par des pourcentages d'inhibition significativement plus faible chez le contrôle que chez les maïs exposés à l'ozone (3,5 m et 2 m). Pour l'effet des dates de prélèvement cela se traduit par une augmentation des pourcentages d'inhibition avec l'âge des plantes, cette hausse étant systématiquement significative entre chaque date de prélèvement ($p < 0.05$), sauf pour P1 et P2 qui présentent des niveaux d'activités similaires ($p > 0.05$).

L'analyse statistique menée séparément pour chaque date de prélèvement révèle quant à elle un effet des traitements pour les prélèvements P1 et P3, ce qui suite à une analyse *post hoc*, se traduit par des différences significatives entre plants contrôles et plants 2 m ($p < 0.05$) ([Fig.33-A](#)).

La part de l'activité protéolytique totale dans les feuilles de maïs, imputable aux protéases à sérine est constante pendant la majeure partie de l'expérimentation. L'analyse statistique menée sur l'ensemble du jeu de données montre cependant un effet significatif de la date de prélèvement sur les valeurs d'activités ($p < 0,05$). Ceci se traduit par une différence significative entre les prélèvements P3 et P4 ($p < 0,05$), qui sont respectivement ceux qui présentent les valeurs d'inhibition maximale et minimale. ([Fig.33-B](#)). Bien qu'il semble y avoir tendance à l'augmentation du pourcentage d'inhibition en réponse aux traitements à l'ozone, ce dernier n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage d'inhibition ($p = 0,058$). Il n'y a pas non plus

d'interaction entre les traitements à l'ozone et la date de prélèvement sur le pourcentage d'inhibition pour cette classe d'endoprotéases ($p < 0,05$).

L'analyse statistique menée séparément pour chaque date de prélèvement, montre un effet significatif des traitements à l'ozone uniquement pour le prélèvement P3 ($p < 0,05$). Ceci se traduit, suite à une analyse *post hoc*, par une différence significative entre plants contrôles et plants 2 m ($p < 0,05$) ([Fig.33-B](#)).

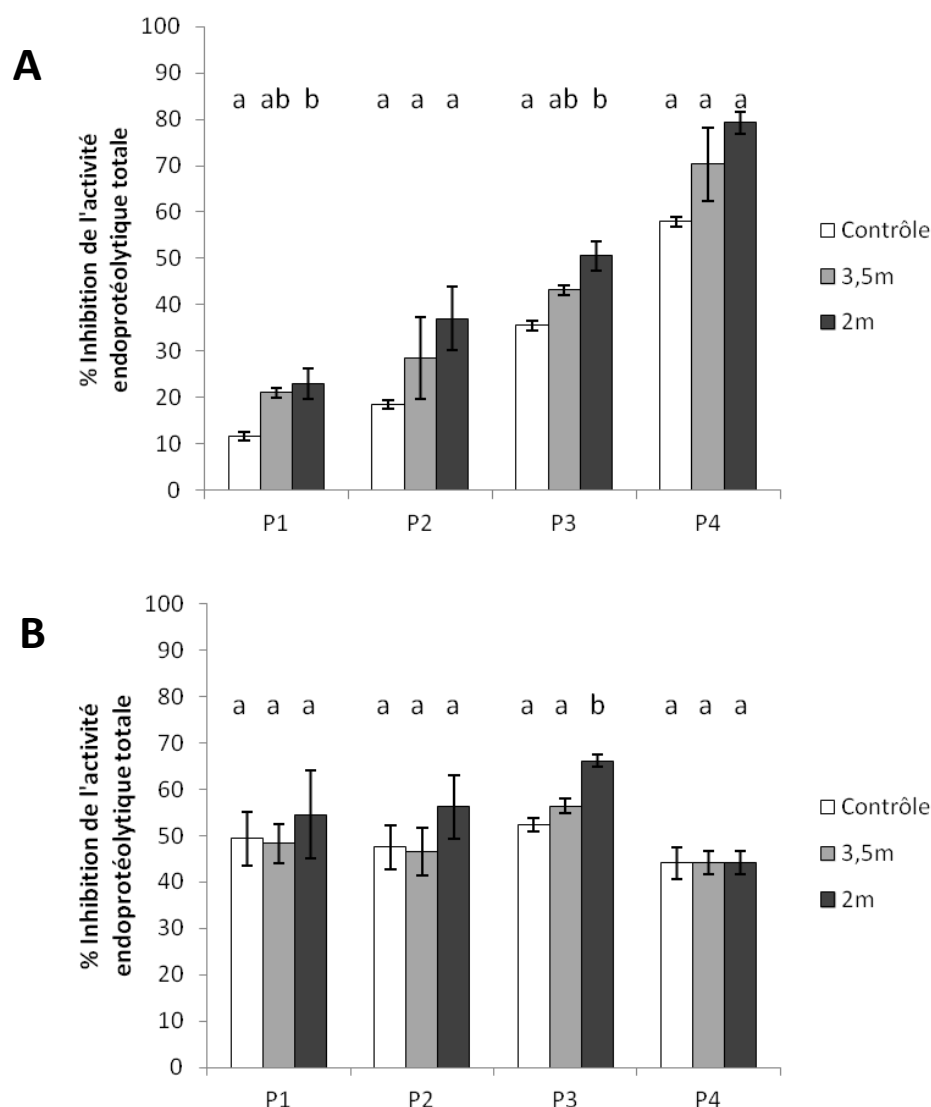


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition (%) des activités endoprotéolytiques totales par des inhibiteurs de deux classes d'endoprotéases. Les extraits protéiques ont été obtenus à partir de feuilles de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone, sur une période de 60 jours. A : Inhibition des protéases à cystéine par le E64. B : Inhibition des protéases à sérine par le Péfabloc. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-5 EVALUATION DES TENEURS EN ROS DANS LES FEUILLES

Les variations des teneurs en ROS dans les feuilles de l'épi ont été suivies pendant la période de fumigation. Ces teneurs sont exprimées en unités de fluorescence rapportées à la quantité de matière fraîche considérée ([Fig.34](#)). L'allure de la courbe de variation de ce paramètre est celle d'une cloche inversée, montrant des valeurs de ROS élevées en début et fin d'expérience et relativement plus basses en milieu de période expérimentale.

Une analyse statistique du jeu de données entier indique un effet significatif de la date de prélèvement, du traitement et de l'interaction de ces deux facteurs ($p < 0,05$). L'influence de la date de prélèvement se traduit par des teneurs en ROS significativement plus élevées pour le prélèvement P1 par rapport au prélèvement P2 et par des teneurs en ROS significativement plus élevées pour le prélèvement P4 par rapport aux prélèvements P2 et P3. L'effet du traitement se traduit quant à lui, par des teneurs en ROS significativement plus élevées chez les plants exposés à 2 m que chez les plants contrôles ($p < 0,05$).

L'analyse statistique menée séparément pour chaque date de prélèvement, montre un effet significatif des traitements à l'ozone uniquement pour les prélèvements P3 et P4 ($p < 0,05$). Ceci se traduit, suite à une analyse *post hoc*, par une différence significative entre plants contrôles et plants 2 m ($p < 0,05$) ([Fig.34](#)).

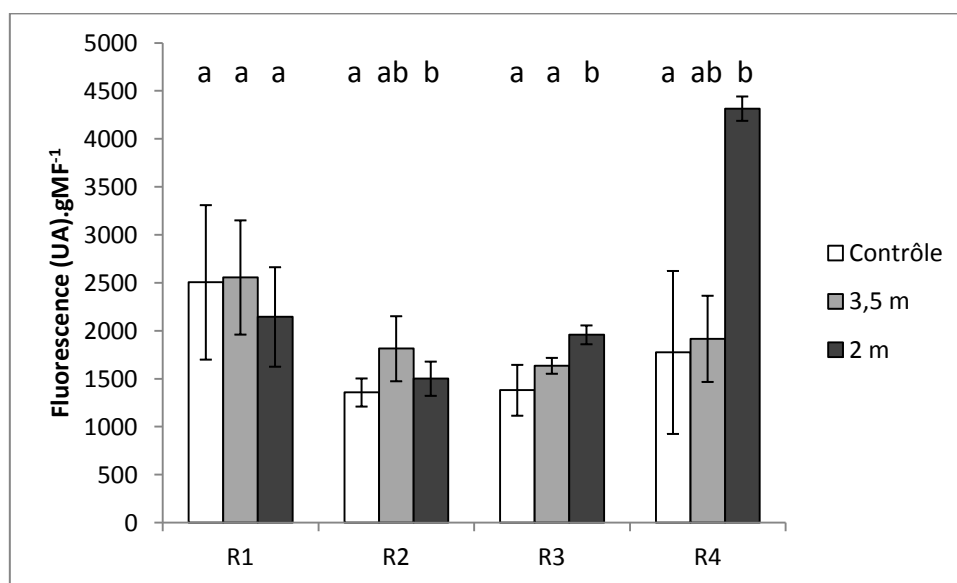


Figure 34 : Teneur en ROS (fluorescence UA. G MF⁻¹) dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n \geq 3$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle

exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-6 NIVEAU D'OXYDATION GLOBALE DES PROTEINES SOLUBLES

Les variations des teneurs en groupements carbonyle sur les protéines foliaires solubles (feuilles de l'épi) ont été mesurées pendant l'expérimentation ([Fig.35](#)). Ces valeurs sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence, relativement à la valeur de la teneur en groupements carbonyle d'un échantillon contrôle récolté neuf jours après le début de la fumigation. L'échantillon contrôle présente en théorie les niveaux de carbonylation les plus faibles. Pour ce paramètre, et comparativement à ce qui est observé pour les teneurs en groupements carbonyle dans les protéines, l'allure des variations des teneurs en groupements carbonyle est celle d'une cloche inversée avec des maxima en début et fin d'expérimentation.

Une analyse statistique du jeu de données entier indique un effet significatif de la date de prélèvement ($p < 0,05$), mais pas du traitement ($p > 0,05$). L'influence de la date de prélèvement ne se traduit pas des différences significatives des teneurs en groupements carbonyle entre chaque prélèvement.

L'analyse statistique menée séparément pour chaque date de prélèvement, montre un effet significatif des traitements à l'ozone uniquement pour le prélèvement P4 ($p < 0,05$). Ceci se traduit, suite à une analyse *post hoc*, par une différence significative entre les plants contrôles et les plants 3,5 m ($p < 0,05$) ([Fig.35](#)) et une forte tendance à la baisse entre les plants contrôles et les plants 2 m avec une valeur de p de 0,051.

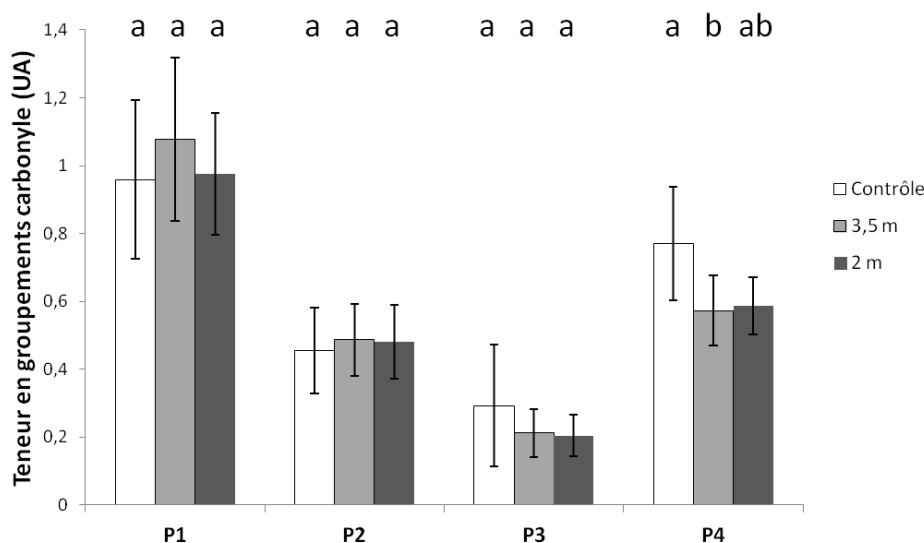


Figure 35 : Teneurs en groupements carbonyle sur les protéines solubles des feuilles de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

V]-7 PEROXYDATION LIPIDIQUE

L'intensité du processus de peroxydation lipidique a été mesurée au cours de la période d'expérimentation ([Fig.36](#)). Ce paramètre est exprimé en nmol d'équivalent MDA par mL d'extrait foliaire, selon la méthode des TBARS. Les résultats montrent une forte diminution des équivalents MDA entre P1 et P2. Les valeurs sont ensuite stables jusqu'à la fin de l'expérimentation (de P2 à P4).

Une analyse statistique du jeu de données entier indique un effet significatif de la date de prélèvement ($p<0,05$) et du traitement ($p<0,05$ sur les équivalents MDA). Ces derniers ne sont cependant pas significativement impactés par l'interaction de ces deux facteurs ($p>0,05$). L'influence de la date de prélèvement se traduit pas des différences significatives de la peroxydation lipidique des échantillons du prélèvement P1 par rapport à tous les autres (P2, P3, P4) ($p<0,05$). L'effet du traitement se traduit quant à lui, par des niveaux d'équivalent MDA significativement plus élevés chez les plants exposés à 2 m que chez les plants contrôles ($p<0,05$).

L'analyse statistique menée séparément pour chaque date de prélèvement, montre un effet significatif des traitements à l'ozone uniquement pour les

prélèvements P2 et P3 ($p<0,05$). Cela se traduit, suite à des analyses *post hoc* : pour P2 par une différence significative des niveaux de d'équivalent MDA des plants contrôles par rapport à ceux des plants exposés à l'ozone (3,5 m et 2 m) ($p<0,05$) ; pour P3 par une différence significative des niveaux d'équivalent MDA des plants 2 m par rapport à ceux des deux autres conditions (Contrôle et 3,5 m) ($p<0,05$) ([Fig.36](#)).

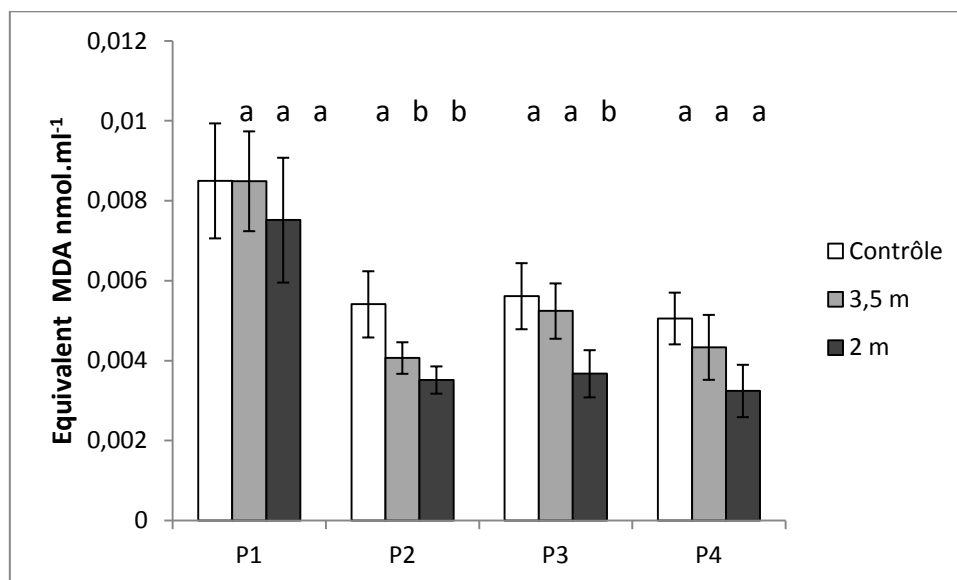


Figure 36 : Niveau de peroxydation lipidique dans la feuille de l'épi de plants de maïs soumis à un air ambiant ou enrichi en ozone sur une période de 60 jours. exprimée en équivalents MDA (nmol.mL^{-1}). Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ ET avec $n=4$. P1, P2, P3 et P4, prélèvements des tissus foliaires respectivement effectué aux JJ : 183 ; 192 ; 209 ; 223. Avec les conditions : contrôle exposé à l'ozone ambiant ; 3,5 m exposé à 3,5 m de la rampe de fumigation ; 2 m exposé à 2 m de la rampe de fumigation

VI] DISCUSSION

La démarche expérimentale de notre étude a consisté à exposer des plants de maïs en champ à des doses croissantes d'ozone et de comparer les réponses des plants soumis à des atmosphères enrichies artificiellement en O₃ à celles de plants exposés aux concentrations ambiantes. Notre but a été d'évaluer les risques que pourrait représenter l'évolution des concentrations d'ozone sur le maïs dans les années à venir, au travers de paramètres de rendement et de paramètres biochimiques et physiologiques.

VI]-1 NIVEAUX D'EXPOSITION A L'OZONE

L'atmosphère des plants exposés à l'ozone a été enrichie au moyen d'un système de fumigation, ce qui a permis, grâce à l'usage du vent comme facteur de dispersion, la création d'un gradient de concentration. Ce type de système présente l'avantage de maintenir les conditions expérimentales au plus proche des conditions conventionnelles de culture du maïs. La fumigation a débuté le 2 juillet 2011, soit 9 jours avant la floraison qui a eu lieu le 11 juillet 2011 (date des prélèvements foliaires P1), et s'est poursuivie pendant 60 jours (jusqu'au 31 août 2011), soit 5 jours avant la première récolte de plants entiers (R1). Au vu des concentrations utilisées dans d'autres études (Mulchi et al., 1995; Rudorff et al., 1996; Leitaó et al., 2007b; Bagard et al., 2015), les niveaux d'exposition à l'ozone pour les plants à 3,5 m et 2 m de la source d'ozone apparaissent comme relativement modestes. Ils correspondent toutefois à des enrichissements en ozone du site de culture dépassant le niveau critique actuellement admis. En effet, le niveau critique admis au-delà duquel une perte de 5 % des rendements est attendue pour le maïs est de 13,9 ppm.h (Mills et al., 2007). Dans notre étude, ce niveau critique n'est jamais dépassé pour les plants contrôles, pour lesquels l'AOT40 culmine à 2,4 ppm.h à la fin de la période de fumigation. De plus, les plants contrôles n'ont été exposés qu'une seule heure à des concentrations dépassant 80 ppb ce qui devrait prévenir l'apparition d'éventuels effets dus à une exposition aiguë à l'ozone. Les conditions ambiantes d'ozone sur le site de l'expérimentation n'ont donc pas été susceptibles d'avoir un effet négatif sur les rendements. Pour les plants surexposés à l'ozone, le niveau critique est atteint

dans les deux conditions de culture, à 3,5 m et 2 m de la source d'ozone, respectivement aux jours juliens 239 (soit 56 jours après le début de la fumigation) et 217 (soit 34 jours après le début de la fumigation). Ainsi, chez les plants de maïs surexposés à l'ozone, les niveaux d'exposition atteints dans notre étude sont susceptibles d'entraîner des pertes de rendement significatives. Les plants exposés à 3,5 m et 2 m présentent en fin de période de fumigation des AOT40 respectifs de 14,9 ppm.h et 24,3 ppm.h, ce qui d'après l'équation liant l'exposition à l'ozone au rendement chez le maïs (Mills et al., 2007), devrait entraîner des pertes de rendement théoriques respectives de 3,4 % et 6,7%.

VI]-2 IMPACT DE L'OZONE SUR LE RENDEMENT

VI]-2-1 ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA TOLERANCE DU MAÏS A L'OZONE

Jusqu'à présent les quelques données bibliographiques disponibles laissaient à penser que le maïs était modérément tolérant à l'ozone (Mills et al., 2007) et les prévisions les plus optimistes pour l'horizon 2030 tablaient sur des pertes de rendement de l'ordre de 4,4 à 8,7 % (Avnery et al., 2011a). Toutefois ces estimations se basent sur une relation exposition-réponse établie à partir d'un faible nombre d'expérimentations (2 dans les années 1980 et 1990) menées sur un seul cultivar de maïs et pour un seul type de conditions pédoclimatiques (Holland et al.; Mills et al., 2007). Afin de compléter les connaissances actuelles dans ce domaine, l'effet des surexpositions à l'ozone décrites précédemment a été suivi depuis la floraison jusqu'à la fin du remplissage des caryopses en analysant les différentes composantes du rendement et de la qualité des grains. L'ensemble des données que nous avons obtenues appuie l'idée que le maïs serait tolérant à l'ozone et que l'impact du polluant modélisé jusqu'à présent a été surestimé. En effet, l'ozone n'a d'effet sur aucun des paramètres de rendement mesurés à l'exception de la teneur en azote dans les tiges. De plus, la comparaison entre nos valeurs de rendement et celles de la fiche technique de référence du cultivar NK Perform (Syngenta), nous indique que les résultats obtenus correspondent à ceux attendus pour ce cultivar pour des concentrations ambiantes d'ozone.

Pour comprendre l'écart entre nos résultats et les données de la littérature, il nous est apparu pertinent de nous intéresser en premier lieu à certaines spécificités

du maïs. Tout d'abord, il s'agit d'une plante à métabolisme C_4 et il est généralement admis qu'elles sont moins sensibles à l'ozone que les plantes à métabolisme C_3 . Cette plus grande résistance pourrait être attribuée à des facteurs structurels et biochimiques.

La diffusion de l'ozone ne pouvant pas se faire au travers de la cuticule, la première ligne de défense des végétaux (en C_3 ou en C_4) contre les polluants atmosphériques se compose des stomates qui assurent les échanges bidirectionnels de vapeur d'eau et de CO_2 ou de tout autre gaz. De fait, le maïs présente, en conditions ambiantes d'ozone, une conductance stomatique (g_s) faible, environ deux fois plus faible que celle du blé. De plus, il a été montré qu'une exposition à l'ozone de plants de maïs jeunes, au stade 5 feuilles, cultivés en pots, en conditions contrôlées sous faible éclaircissement ($350 \mu\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) réduit la conductance stomatique de l'ordre de 50 % et l'assimilation nette de 25 à 30% (Bagard et al., 2015). On pourrait donc penser que l'ajustement stomatique est un des processus biologiques expliquant la tolérance du maïs à l'ozone, une faible g_s limitant l'entrée du polluant photochimique. Cependant, les mesures de conductances stomatiques effectuées au cours de cette étude ne sont pas en adéquation avec cette proposition. En effet, à l'exception des derniers jours de fumigation, elles ne diminuent pas en réponse à l'ozone.

Une diminution de la g_s , s'accompagne généralement d'une diminution de l'assimilation ; toutefois, le maïs comme toutes les plantes en C_4 , présente une photosynthèse en deux étapes avec une spécialisation des cellules aboutissant à un système de concentration du CO_2 au niveau de la Rubisco, enzyme responsable de la fixation du carbone. La feuille est structurée avec deux types de cellules photosynthétiques, les cellules du mésophylle, avec des chloroplastes riches en grana et dépourvus de Rubisco et les cellules de la gaine périvasculaire, avec des chloroplastes de très grande taille pauvres en grana mais riches en Rubisco. Lorsque les stomates sont ouverts, le CO_2 diffuse dans la cavité sous-stomatique et passe dans les cellules du mésophylle où il est converti en bicarbonate par une anhydrase carbonique cytosolique. C'est sous cette forme qu'il est additionné par la PEPc cytosolique au phosphoénolpyruvate pour former de l'oxaloacétate qui est transféré dans les chloroplastes et réduit en malate. Ce dernier est ensuite exporté vers les

cellules chlorophylliennes constituant la gaine périvasculaire pour y être décarboxylé libérant ainsi une molécule de CO_2 qui participe au cycle de Calvin grâce à la Rubisco. Ce système de fixation en deux temps bien que plus coûteux en énergie que la photosynthèse C_3 (coût = 2 ATP supplémentaires par CO_2 fixé) présente l'avantage de saturer la fonction carboxylase de la Rubisco en augmentant d'un facteur 3 à 10 (Sage and Stata, 2015) la concentration en CO_2 au site actif et limitant ainsi la fonction oxygénase (associée à la photorespiration) qui représente en moyenne sur une plante en C_3 en air ambiant 30% de l'activité totale de cette enzyme. Par ailleurs, les caractéristiques de la PEPc, qui présente une K_m six fois plus petite pour HCO_3^- et donc une affinité six fois plus élevée pour le CO_2 (sous sa forme dissoute) que la Rubisco et une absence de fonction oxygénase, permettent d'obtenir des vitesses de carboxylation d'environ 2 à 3 fois supérieures à celles des plantes C_3 . Ainsi, le maïs peut assurer une forte photosynthèse sans avoir besoin d'ouvrir très largement ses stomates, ce qui le préserve en théorie d'un flux entrant d'ozone trop élevé. Cependant comme décrit précédemment, Bagard et al. (2015) observent en réponse à l'ozone une diminution de l'assimilation nette allant jusqu'à 40%, qui peut être mise en relation avec des baisses de l'activité PEPc pouvant atteindre 70%, la Rubisco présentant une baisse plus limitée (-30%) de son activité. Nous ne disposons malheureusement pas d'information sur l'activité de ces enzymes dans le cadre de notre expérimentation mais nos résultats montrant une baisse significative de l'assimilation nette de l'ordre de 50% en réponse à l'ozone, il est donc vraisemblable que l'activité Rubisco et/ou celle de la PEPc ont été affectées négativement dans le cadre de notre étude. Cependant, cette sensibilité de l'appareil photosynthétique ne se traduit pas par une perte au niveau du rendement. Ainsi, en fonction du niveau d'intégration choisi dans la biologie des réponses du maïs à l'ozone (biochimie photosynthétique ou rendement en biomasse), les conclusions peuvent être en décalage (sensibilité ou résistance).

Les résultats décrits ci-dessus indiquent que d'autres éléments que ceux liés à la g_s et à la photosynthèse sont à prendre en compte pour expliquer l'absence d'effet sur le rendement. La feuille de maïs possède une architecture particulière et est organisée de telle façon qu'avant d'atteindre les cellules de la gaine et la Rubisco, le parcours diffusif de l' O_3 est particulièrement long et les cellules du mésophylle, bien supérieures en nombre à celles de la gaine, représentent autant de sites d'élimination potentielle de l' O_3 et des ROS associés. Après diffusion stomatique, il est

admis que la réactivité de l'ozone ou de ses sous-produits (ROS) entraîne leur élimination au contact des cellules du mésophylle dans ou à proximité de la chambre sous-stomatique (Laisk 1989). Chez les plantes C_3 , la structure du parenchyme lacunaire très lâche permet aux gaz et à l'ozone de diffuser jusqu'au parenchyme palissadique, siège principal de la photosynthèse. Chez les plantes C_4 , l'absence de parenchyme palissadique et la densité des cellules du mésophylle qui entourent la gaine périvasculaire, sont des éléments qui peuvent assurer une certaine forme de protection physique des cellules de la gaine, en allongeant le parcours diffusif de l'ozone et en offrant par la même des opportunités supplémentaires au système antioxydant de circonscrire les ROS avant qu'ils ne puissent entraîner des dégâts sur la gaine, lieu de la fixation du carbone par la Rubisco. Ces éléments pourraient fournir une explication aux résultats de Bagard et al. (2015), qui constatent, en réponse à l'ozone, d'importantes baisses des activités PEPc (-70 %) tandis que celles de la Rubisco sont moindres (-30 %). Les travaux de Singh et al. (2014) sur le maïs mettent en évidence une augmentation des teneurs en radicaux hydroxyle et en peroxyde d'hydrogène en réponse à l'ozone qui semble se limiter aux cellules de garde des stomates et des trichomes. L'hypothèse avancée précédemment sur la barrière physique que pourrait représenter le mésophylle chez les plantes C_4 serait une explication possible au confinement du stress oxydant et viendrait fournir un argument supplémentaire en faveur d'une action protectrice de celui-ci sur les cellules de la gaine périvasculaire. Ainsi, l'architecture cellulaire des feuilles de maïs pourrait constituer une autre explication de l'absence d'effet de l'ozone sur le rendement.

Cependant si la Rubisco semble relativement épargnée, la PEPc se retrouve quant à elle clairement exposée à l'action oxydante des ROS. Les expériences réalisées en *FACE* (*Free-Air Carbon dioxide Enrichment*) ont mis en évidence que la photosynthèse chez le maïs et plus généralement chez les plantes C_4 était insensible à l'augmentation de concentration en CO_2 atmosphérique. Ces résultats s'expliquent par le fait que les concentrations en CO_2 à l'intérieur de la gaine périvasculaire sont largement supérieures aux concentrations atmosphériques. Ils indiquent également que les capacités d'assimilation primaire du carbone sont, à la différence des C_3 , largement saturées chez les C_4 . La Rubisco apparaît alors comme l'enzyme limitant la photosynthèse, ce qui suggère que l'activité PEPc est en excès chez le maïs. Ainsi, une diminution de cette dernière, consécutive au stress oxydant, n'affecterait

pas les niveaux d'assimilation demeurant suffisants pour garantir les rendements. Il semble toutefois important de rappeler que les mesures que nous avons réalisées n'ont concerné que la feuille de l'épi. Il n'est pas impossible que les autres feuilles présentent des réponses photosynthétiques différentes ayant pu jouer un rôle dans le maintien du rendement chez les plants ozonés.

Un élément supplémentaire à l'explication de la tolérance du maïs à l'ozone pourrait impliquer les capacités antioxydantes. Une relation flux-réponse serait un bon indicateur de son efficacité ; malheureusement la littérature est pauvre à ce sujet, ce qui semble symptomatique des difficultés à établir une relation entre dose d'ozone et rendement pour cette espèce végétale. Bagard et al. (2015) ont effectué une synthèse entre paramètres physiologiques (échanges gazeux, teneurs en chlorophylles), photosynthèse et activités Rubisco et PEPc. Le meilleur indice qu'ils aient pu obtenir pour le maïs est le $POD_{0,5}$. Le seuil de flux instantané de $0,5 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ reflète un flux stomatique d'ozone entrant faible chez le maïs mais suggère aussi de faibles capacités de détoxification des ROS. Les résultats de l'étude citée montrent en effet des baisses des teneurs en chlorophylles (ainsi que des baisses des activités PEPc et Rubisco, de l'assimilation), paramètres tous mesurés sur la 5^{ème} feuille de plants juvéniles. Ces résultats sont-ils transposables à la feuille de l'épi (en général de rang 10) et aux feuilles de rang supérieur ? En effet, des travaux sur les niveaux de transcrits de la PEPc et de la Rubisco ont souligné des différences physiologiques entre les 5^{ème} feuilles et celles de l'épi. Si sur la première on enregistre bien une diminution du nombre de transcrits en réponse à l'ozone, les feuilles de l'épi présentent des comportements plus complexes avec dans certaines conditions une augmentation du niveau des transcrits en réponse à l'ozone (Leitao et al., 2007b), ce qui témoigne des réponses différentielles chez la plante en fonction de l'étage foliaire. Toutefois, dans le cadre de notre expérimentation, des relations dose-réponse ont pu être établies pour l'assimilation nette suggérant un indice POD avec un seuil de flux instantané compris entre 0 et $1 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, valeurs qui sont similaires à celles obtenues en conditions contrôlées (Bagard et al., 2015) et qui suggèrent donc de faible capacité de détoxification chez le maïs.

La littérature rapporte des effets négatifs de l'ozone sur les capacités photosynthétiques du maïs qui s'apparentent à la diminution de l'assimilation nette

observée au cours notre expérimentation chez les plants de maïs surexposés à l'ozone. Les études citées tout comme nos travaux n'appuient donc pas l'hypothèse d'une résistance à l'ozone due à une régulation de son influx ; il faut donc rechercher d'autres explications à l'absence d'impact de l'ozone sur nos rendements.

Une piste à creuser pour comprendre la stabilité des rendements dans conditions de surexposition à l'ozone repose sur l'évolution du maïs depuis sa domestication à nos jours. Les pressions de sélection qui lui ont été appliquées ont essentiellement cherché à améliorer les rendements. Ainsi, la commercialisation des premiers cultivars de maïs hybrides dans les années 1930 a initié le début d'une période de forte augmentation des rendements qui s'est intensifiée dans les années 1990 avec les progrès des biotechnologies et le développement des OGMs (Troyer, 2006). Plus récemment, il a été montré que l'augmentation des rendements chez les cultivars les plus récents était due à l'amélioration des capacités photosynthétiques et à leur maintien au-delà de l'anthèse (Li et al., 2014). Il semblerait par ailleurs que les augmentations de rendement induites par l'amélioration génétique des hybrides reposent avant tout sur une augmentation de leurs tolérances aux stress (Tollenaar and Lee, 2002). Ainsi la sélection de cultivars toujours plus performants dans un contexte où les teneurs en ozone troposphérique augmentent, serait une explication plausible de l'absence d'effet de l'ozone sur le rendement.

Enfin le potentiel d'assimilation/translocation pourrait permettre au maïs de maintenir des niveaux de rendements élevés malgré une diminution de ses capacités photosynthétiques, grâce à une remobilisation efficace des ressources pour le bouclage du cycle. Un tel phénomène a été suggéré chez *Brassica campestris*, chez qui une exposition à l'ozone n'impacte pas les rendements en grains mais entraîne une altération des tissus végétatifs (Black et al., 2007). Nous ne disposons malheureusement pas d'information sur la remobilisation des ressources dans les plants de notre dispositif. Cependant, il a été montré que chez le maïs la remobilisation rapide du carbone depuis les tiges participait grandement au remplissage des grains (Dwyer et al., 1995). Il est donc fortement possible que la remobilisation des ressources carbonées et azotées par des mécanismes d'hydrolyse depuis les tissus végétatifs jusqu'aux grains en cours de développement participent au maintien des niveaux de rendements en réponse à l'ozone. La

recherche de mécanismes compensatoires visant à pallier l'effet négatif de l'ozone sur les capacités d'assimilation semble une voie intéressante pour permettre l'établissement d'un nouveau type d'indice de POD spécifique au maïs en définissant une intensité de stress ozoné au-delà de laquelle les mécanismes de compensation ne seraient plus suffisants pour éviter les pertes de rendement.

Comme nous l'avons déjà répété, notre étude montre que le maïs est capable de maintenir les niveaux de rendement classiquement attendus malgré une exposition à des niveaux d'ozone qui dépassent le niveau critique de 13,9 ppb.h, au-delà duquel on peut s'attendre à observer des pertes de rendement significatives. Après avoir tenté de synthétiser les éléments physiologiques et génétiques qui pourraient participer à ce maintien des rendements, il nous apparaît maintenant légitime de nous interroger sur le bien-fondé de la relation exposition-réponse actuellement retenue pour le maïs.

VI]-2-1 LIMITES DE LA RELATION EXPOSITION-REPOSE POUR LE MAÏS

La relation disponible qui a permis la mise en place de l'essentiel des modélisations de pertes de rendement du maïs en réponse à l'ozone (Van Dingenen et al., 2009; Avnery et al., 2011b) se base sur la relation liant AOT40 et rendement établie par Mills et al. (2007). Pour établir cette équation, les auteurs se sont basés sur des données issues de trois articles de (Kress and Miller, 1985; Mulchi et al., 1995; Rudorff et al., 1996) reposant sur deux expérimentations de fumigation en chambres à ciel ouvert (open-top chambers, OTC). Chacune de ces études montre un impact négatif de l'ozone sur le rendement du maïs. Nous allons discuter des différences expérimentales entre ces trois études et la nôtre.

Une différence majeure réside dans le fait que nous avons mené notre étude en champ à l'aide d'un système de fumigation ouvert, afin de s'approcher au plus près des conditions réelles de cultures, alors que les trois études citées précédemment ont toutes été menées en chambre à ciel ouvert. Or, les limites ce type de système sont connues depuis longtemps et sont responsables de nombreux biais expérimentaux (Fuhrer, 1997). Le simple fait que les OTCs soient des chambres transparentes induit des différences environnementales importantes entre

l'intérieur et l'extérieur de la chambre bien que leur sommet soit ouvert. Les plantes qui y poussent ne sont pas exposées aux mêmes conditions que celles se développant en champ. Le rayonnement solaire qui pénètre les chambres est en partie intercepté par les parois, tout comme les précipitations, les pathogènes n'y circulent pas librement. L'accumulation et la distribution des gaz sont également modifiées du fait de l'existence de turbulences. Dans le cas d'une exposition à l'O₃, les concentrations en ozone ambiant sont plus élevées à l'intérieur qu'à l'extérieur de la chambre (Fuhrer, 1997; Long et al., 2005). Au champ, les feuilles basses d'un couvert végétal échangent moins avec l'atmosphère que les feuilles plus hautes. Or, dans les OTCs, les turbulences permettent des transferts de gaz vers l'ensemble des feuilles, souvent sans relation avec leur position verticale. Ainsi, en augmentant la surface foliaire d'échanges gazeux, les effets étudiés sont souvent exacerbés. De plus, en agronomie et en écologie, les expérimentations menées en petites parcelles isolées ont tendance à surestimer les effets des traitements sur la biomasse, la productivité et le rendement (Roberts et al., 1993). Les expériences menées en OTC ne représentent donc pas des expérimentations agronomiques robustes et devraient idéalement s'accompagner d'expérimentations en champ afin d'infirmier ou d'affirmer les résultats observés en chambre (McLeod and Long, 1993)

Les données qui ont conduit à l'établissement de la relation exposition-réponse de Mills et al. (2007) pour le rendement du maïs correspondent à un petit jeu de données qui de plus ne satisfait pas aux trois critères énoncés par Holland et al. (2006) qui, d'après les auteurs, garantissent une certaine robustesse à ce type d'équation. Ces critères sont : un minimum de cinq cultivars testés, dans au moins deux zones climatiques différentes, le tout pour un minimum de 20 expérimentations conduites. Le décalage entre nos observations et les prévisions issues de ces modélisations est donc très certainement due aux lacunes dans nos connaissances des effets de l'ozone sur le maïs et invite à remettre en cause la relation exposition-réponse liant ozone et maïs en tenant compte de nos résultats.

VIJ-3 Evolution des teneurs en protéines foliaires au cours du développement et en réponse à l'ozone.

Afin d'évaluer la progression de la sénescence foliaire au cours de la période de fumigation, deux paramètres indicateurs de ce processus ont été mesurés : la teneur en protéines foliaires solubles, connue pour diminuer avec l'âge et en réponse aux contraintes environnementales, par l'intermédiaire de mécanismes d'autolyse (Breeze et al., 2011; Guiboileau et al., 2013) ; la teneur en chlorophylles totales, considérée comme un bon indicateur de la sénescence (Gepstein, 2004; Munné-Bosch and Alegre, 2004).

Les mesures effectuées sur la feuille de l'épi de plants exposés aux concentrations ambiantes d'ozone montrent une diminution continue et progressive des teneurs en protéines foliaires solubles totales avec l'âge des feuilles, confirmant ainsi le lien entre vieillissement et teneur en protéines foliaires évoqué plus haut. La teneur en protéines foliaires solubles totales diminue également en réponse à l'ozone et ceci d'autant plus que le niveau d'exposition à l'ozone est élevé. Ces résultats viennent appuyer l'idée d'une accélération de la sénescence induite par l'ozone.

L'hypothèse d'une relation entre rendement et sénescence est ancienne (Thomas and Stoddart, 1980) et se base sur les postulats que : 1) la teneur en chlorophylles totales est un bon indicateur de la sénescence et que 2) le maintien de l'activité photosynthétique à des niveaux élevés a un effet positif sur le rendement.

Chez le maïs, en adéquation avec 1) le rendement dépend principalement du maintien des capacités photosynthétiques (Borrás et al., 2004). C'est en tout cas ce que semble confirmer notre étude, en effet, si l'assimilation nette est bien réduite par l'ozone, les teneurs en chlorophylles totales quant à elles varient peu. Les plants de maïs exposés aux niveaux ambiants d'ozone présentent en effet des teneurs en chlorophylles totales constantes pour la feuille de l'épi tout au long de la période de fumigation. Ceci pourrait indiquer que la feuille de l'épi n'a pas amorcé son entrée en sénescence durant la période de nos observations. Bien que l'analyse statistique révèle une diminution significative des teneurs en chlorophylles en réponse à l'ozone pour les plants fortement exposés, la différence avec les plants contrôles est néanmoins très faible et empêche de conclure à une entrée en sénescence accélérée. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus chez d'autres espèces végétales dont les teneurs foliaires en chlorophylles diminuent en réponse aux traitements à

l'ozone (Bagard, 2008; Feng et al., 2011; Caregnato et al., 2013). Cependant, ils présentent certaines similitudes avec ceux d'autres études sur le maïs. Tout d'abord, avec celle de (Leitao et al., 2007a) montrant que des teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes augmentent dans les feuilles de l'épi exposées à des AOT40 de plus de 10 ppm.h. En revanche, des AOT40 plus élevés, de l'ordre de 14,6 ppm.h, entraînent une baisse de 20% des teneurs en chlorophylles totales. Dans notre étude, une AOT comparable de 14,9 ppm.h n'impacte pas du tout ce paramètre. Il faut noter que l'étude de Leitao et al. (2007a) a été conduite en OTC, avec les limites de ce type de système, décrites dans le paragraphe (51-2-1) (notamment les risques de surexposition). Une seconde étude, celle de (Singh et al., 2014b) également conduite en OTC, montre des augmentations des teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes en réponse à l'ozone et ceci pour des niveaux d'AOT40 allant jusqu'à 20,6 ppm.h. Parallèlement, ces auteurs observent une diminution des teneurs en protéines en réponse à l'ozone et à l'âge. L'ensemble de ces éléments indiquent que le maïs parvient à maintenir, voire à augmenter dans certaines conditions expérimentales, ses teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes malgré l'exposition à des doses d'ozones conséquentes. Ce maintien/ajustement des teneurs en pigments foliaires observé assez fréquemment semble correspondre à une spécificité de réponse du maïs qui participerait à sa tolérance à l'ozone. Les pigments chlorophylliens offriraient l'avantage d'aider au maintien de la photosynthèse en captant l'énergie lumineuse, alors que la très probable augmentation des caroténoïdes fournirait un surplus de pouvoir réducteur permettant de limiter les effets de l'ozone.

Cependant, comme décrit précédemment, les mécanismes de sélection ont favorisé le maintien des capacités photosynthétiques au cours du développement du maïs (LI et al., 2015). Ceci invite à remettre en cause le consensus selon lequel les teneurs en chlorophylles sont des indicateurs de sénescence, rôle les teneurs en protéines foliaires sont plus à même de tenir.

VI]-4 IMPACT DU STRESS OXYDANT INDUIT PAR L'OZONE SUR LES COMPOSANTS CELLULAIRES DE FEUILLES DE MAÏS

VI]-4-1 EVOLUTION DU NIVEAU DE CARBONYLATION DES PROTEINES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU MAÏS ET EN REPONSE A L'OZONE

La teneur en groupements carbonyle est considérée comme un bon indicateur du niveau global d'oxydation des protéines (Møller et al., 2011). Dans les feuilles de l'épi, les profils globaux d'oxydation observés au cours de notre étude (données non montrées) révèlent un signal de carbonylation sur une large gamme de protéines. Ces résultats semblent en adéquation avec ceux de la littérature, en effet Prins et al.(2011), ont montré que le niveau de carbonylation est fortement corrélé à l'âge des feuilles chez le maïs, et les profils d'oxydation qu'ils présentent pour les feuilles 9 à 12 sont similaires à ceux que nous avons obtenus pour la feuille 10 (feuille de l'épi).

Au cours de l'expérimentation, les variations des niveaux de carbonylation dans les feuilles des plants traités ont une allure de cloche inversée, avec des niveaux maximum au moment de la floraison et en fin de traitement à l'ozone. Ces résultats soulignent l'importance du stade de développement sur le niveau global d'oxydation des protéines. La pré-floraison - floraison en particulier apparaît comme un stade critique durant lequel les ROS endogènes joueraient le rôle de molécules signal (Tripathi, 2007; Martín et al., 2013) et pendant lequel un niveau élevé d'oxydation global des protéines peut être mesuré (Johansson et al., 2004; Havé et al., 2015). Après la floraison, on observe une diminution du niveau d'oxydation global des protéines foliaires, qui a également été observé chez *Arabidopsis* (Johansson et al., 2004; Qiu et al., 2008) Ces résultats soulèvent des questions intéressantes qui dépassent le cadre de notre étude, sur le rôle possible de la carbonylation au cours du développement des plantes et sur les mécanismes mis en place par les plantes pour gérer les niveaux d'oxydation de leurs protéines au cours de leur cycle de développement.

L'augmentation du niveau de carbonylation des protéines dans les feuilles âgées et surexposées à l'ozone est vraisemblablement liée à la progression de la sénescence et à la baisse des capacités antioxydantes dans la feuille de l'épi. Il est en effet admis que la sénescence s'accompagne d'une baisse des activités de

certaines enzymes antioxydantes (Foyer and Noctor, 2009). Toutefois, si les résultats concernant le dernier prélèvement foliaire (P4) indiquent bien une augmentation des teneurs en groupements carbonyle pour toutes les conditions testées, ils indiquent également une baisse significative de ces dernières en réponse à l'ozone, ce qui va à l'encontre de ce que l'on pourrait attendre.([Fig.35](#)). Cependant, la littérature rapporte des résultats indiquant le maintien ou l'activation de la machinerie antioxydante en réponse à une contrainte hydrique par exemple_(Hameed et al., 2011; Pyngrope et al., 2012). Singh et al. (2014) ont également relevé une augmentation des activités des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase, la glutathion réductase ou l'ascorbate peroxydase, chez des plants de maïs surexposés à l'ozone. La baisse des niveaux de carbonylation observée dans notre étude serait alors une conséquence de la lutte contre les ROS.

Cependant il est important de rappeler que ces dernières observations s'opposent aux conclusions tirées précédemment sur le POD_y qui suggère de faibles capacités détoxifiantes de la machinerie antioxydante. Nous ne disposons malheureusement pas d'élément permettant d'expliquer ce décalage, mais cela invite à poursuivre les investigations sur les capacités antioxydantes du maïs.

VI]-4-2 CARACTERISATION DES TENEURS EN ROS AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU MAÏS ET EN REPONSE A L'OZONE

Les teneurs en ROS chez les plants exposés aux concentrations ambiantes d'ozone sont maximales en début d'expérimentation et diminuent significativement ensuite pour se maintenir à un niveau plus ou moins constant. Ces résultats semblent corroborer la discussion précédente concernant l'importante implication des ROS durant la floraison. De plus, ils peuvent directement expliquer les niveaux d'oxydation des protéines foliaires observés à ce stade de développement.

En réponse aux traitements à l'ozone, ce n'est que pour les plants les plus fortement exposés et en fin d'expérimentation que l'on observe une forte augmentation des teneurs foliaires en ROS qui peuvent être imputée à l'intensité du niveau d'ozonation. Pour ces plantes, on n'observe pas d'augmentation de la teneur en groupements carbonyle, comme cela pourrait être attendu ([Fig.34](#)). Une

explication possible à cette apparente contradiction est que la formation de groupements carbonyle sur les protéines nécessite l'intervention d'espèces radicalaires de type hydroxyle (Blakeman et al., 1998) alors que les ROS mesurés ne sont pas de nature radicalaire. De fait, la technique utilisée pour mesurer les ROS fait appel à une sonde H_2DCFDA développée pour être spécifique du peroxyde d'hydrogène et dont quelques auteurs ont pu montrer qu'elle pouvait réagir avec d'autre ROS tel que le radical hydroxyle $HO^\bullet$ (Myhre et al., 2003; Gomes et al., 2005). L'accumulation de ROS observée dans les échantillons foliaires et fortement exposés à l'ozone pourrait donc correspondre essentiellement à une accumulation de H_2O_2 , incapable d'induire des carbonylations sur les protéines. Cette accumulation de H_2O_2 pourrait provenir de la réaction de dismutation de l'anion radicalaire superoxyde $O_2^\bullet$ en H_2O_2 catalysée par la superoxyde dismutase dont la stimulation en réponse à l'ozone a été évoquée précédemment (Singh et al., 2014b).

VI]-4-3 EVOLUTION DU NIVEAU DE PEROXYDATION LIPIDIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU MAÏS ET EN REPONSE A L'OZONE

Les niveaux de peroxydation lipidique ont été évalués en mesurant les niveaux de MDA grâce à la méthode TBARS (Hodges et al., 1999)). Bien que cette technique ne permette qu'une détermination indirecte de la peroxydation lipidique, elle demeure celle qui est la plus utilisée.

Comme les deux paramètres discutés précédemment, le niveau de peroxydation lipidique est maximal en début d'expérimentation et plus ou moins constant pendant le reste de la période d'observation. Différentes études ont montrées que les lipides constituaient des cibles privilégiées des ROS (Anjum et al., 2015; Chmielowska-Bak et al., 2015). Des augmentations de la peroxydation lipidique en réponse à l'ozone ont d'ailleurs été observées : chez la pomme de terre (Kumari et al., 2015), mais également chez le maïs pour lequel il existe une corrélation entre niveau de peroxydation lipidique et teneur en ROS (Singh et al., 2014b). Ceci pourrait donc expliquer les similitudes dans l'évolution des teneurs en ROS et de celles de la peroxydation lipidique au cours de la période de fumigation.

La condition d'exposition à l'ozone à un effet significatif sur la peroxydation lipidique ($p < 0,05$). En effet, si les plants surexposés à l'ozone connaissent des évolutions de leur peroxydation lipidique similaires à celle des plants exposés aux niveaux d'ozone ambiants, les plants cultivés à 2 m de la rampe affichent des niveaux significativement inférieurs à ceux des plants contrôles. Ainsi la logique habituelle consistant à expliquer des niveaux de peroxydation lipidique par des teneurs en ROS rencontre ici ses limites. Néanmoins, la mise en place de mécanismes antioxydants en réponse à l'ozone, déjà évoquée précédemment dans l'étude de Singh et al. (2014), pourrait fournir une explication à nos résultats originaux. Il est tout de même important de noter que les auteurs ont observé une augmentation des teneurs en MDA pendant leur expérience, contrairement à nous. Il est néanmoins possible que ces différences des niveaux de peroxydation lipidique entre notre étude et la leur soient dues aux conditions expérimentales : en effet, au cours de notre expérimentation, le maïs n'a pas été irrigué (les précipitations ont été considérées comme suffisantes) et bien que 2011 ne fut pas une année particulièrement aride, il reste toutefois possible que les conditions en champ (intensité lumineuse, par exemple) aient induit la synthèse de molécules antioxydantes telles que le tocophérol. Ce dernier est connu pour être produit en réponse à la sécheresse et aux stress oxydants. L' α -tocophérol en particulier, a la particularité d'inhiber la propagation de la peroxydation lipidique et de l'oxygène singulet (Munné-Bosch and Alegre, 2004). Bien que le rôle joué par ces molécules dans notre étude demeure de l'ordre du postulat, il présente l'avantage d'expliquer en partie les évolutions des teneurs en ROS, des niveaux de peroxydations lipidiques et de carbonylation des protéines. Tout ceci ouvre d'intéressantes voies de recherche. De plus, chez le maïs, ces molécules semblent jouer un rôle dans l'exportation des photoassimilats depuis les feuilles vers les organes puits (Sattler et al., 2003), ce qui pourrait avoir contribué au maintien des rendements pour les plants ozonés de notre étude.

VII-5 CARACTERISATION DE LA PROTEOLYSE EN REPONSE A L'OZONE

VII-5-1 ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUES TOTALES

Les données de la littérature concernant l'impact de l'ozone sur l'activité protéolytique des feuilles de maïs sont très limitées. Les travaux d'Ahmad et al (2012-2014) ont mis en évidence le rôle des métacaspases dans de telles réponses. D'une manière générale, les protéases présentent des pH d'activité optimale très variables (Tsiatsiani et al., 2011). C'est pourquoi nous avons établi un profil de l'activité endoprotéolytique totale en fonction du pH ([Fig.36](#)). Ce dernier a montré que les essais menés à partir d'extraits foliaires de maïs obtenus dans nos conditions expérimentales présentaient un maximum d'activité en réponse à l'ozone aux alentours de pH=6. Ceci laisse à penser que l'essentiel des activités endoprotéolytiques dans les feuilles de maïs correspond aux protéases vacuolaires (Vierstra, 1996).

En condition ambiante d'ozone, les activités endoprotéolytiques dans la feuille de l'épi augmentent brutalement en fin d'expérimentation, augmentation en lien avec le processus de sénescence naturelle. L'augmentation des activités endoprotéolytiques vacuolaires avec la sénescence a déjà été mise en évidence chez d'autres espèces : chez le blé (*Triticum sp*) (Martínez et al., 2007; Havé et al., 2015), chez le haricot niébé (*Vigna unguiculata*) (Khanna-Chopra et al., 1999) et le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Hieng et al., 2004)

Une stimulation de l'activité protéolytique en réponse à une exposition chronique à l'ozone a déjà été montrée chez le maïs (Ahmad, 2012), mais également chez le blé (Havé, 2013). Cependant, dans le cadre de notre étude, l'ozone n'a pas d'effet significatif sur l'activité endoprotéolytique totale bien qu'une tendance à l'augmentation de cette activité se dessine très clairement en fin d'expérience ([fig.32](#)). Ces résultats peuvent paraître surprenant au regard des différences entre les valeurs de fluorescence moyennes constatées pour les différentes conditions ([fig.32](#)) ; cependant la dispersion des points en fin d'expérimentation (P4) semble correspondre à une période charnière, à partir de laquelle l'effet combiné de l'âge et de l'ozone fait augmenter considérablement l'activité des protéases vacuolaires dans une partie des individus analysés, tandis que d'autres semblent parvenir à maintenir une certaine homéostasie cellulaire.

L'augmentation des activités endoprotéolytiques foliaires a pu être associée à la baisse des teneurs en protéines solubles chez le blé, en réponse à la sécheresse (Simova-Stoilova et al., 2010) et à l'ozone (Havé, 2013). Nos résultats fournissent peu d'arguments en faveur d'une telle relation chez le maïs. En effet la baisse observée des teneurs en protéines, en réponse à l'ozone est progressive, alors que l'augmentation des activités endoprotéolytiques est brutale, en fin d'expérience. Les baisses de teneurs en protéines au cours de la période de fumigation, liées à la sénescence et celles dues à l'ozone doivent donc dépendre de différents mécanismes de régulation de la protéolyse.

Le rôle du protéasome 26S en réponse aux contraintes biotiques (Dielen et al., 2010) et abiotiques (Kumar and Venkateswarlu, 2011) est largement reconnu comme un mécanisme de régulation et défense des plantes permettant la dégradation des protéines altérées. Toutefois, la dégradation des protéines oxydées est généralement attribuée au protéasome 20S (Basset et al., 2002; Kurepa and Smalle, 2008; Polge et al., 2009). Les agrégats que les protéines oxydées ont tendance à former lors de contraintes oxydantes sévères en font de mauvais substrats pour le protéasome 20S (Basset et al., 2002) et seraient alors dégradés par les protéases de la vacuole, vers lesquelles les agrégats sont transportés par macro-autophagie (Xiong et al., 2006). Bien qu'hypothétique, l'action du protéasome 20S pourrait être responsable des baisses de teneurs en protéines foliaires solubles mises en œuvre progressivement, tandis que les protéases vacuolaires seraient majoritairement responsables de celles observées en toute fin d'expérience.

On peut également proposer que l'augmentation de l'activité des protéases vacuolaires à P4 soit la résultante des deux processus suivants : la progression de la sénescence des feuilles (ce qui correspondrait aux mécanismes de remobilisation de l'azote et du carbone depuis les tissus foliaires vers les grains) et la présence de l'ozone qui ne fait que modifier l'intensité des mécanismes déjà en place. Si ce surcroît d'activité protéolytique chez les plants exposés correspond à une augmentation de la remobilisation des ressources depuis les tissus foliaires vers les grains, les plants disposeraient ainsi d'un mécanisme supplémentaire pour limiter les effets du polluant sur le remplissage de leurs grains.

VI]-5-2 ACTIVITES ENDOPROTEOLYTIQUES SPECIFIQUES

L'utilisation d'inhibiteurs dits spécifiques a eu pour but de déterminer le niveau d'implication des quatre grandes classes de protéases (protéases à cystéine, protéases à sérine, protéases à aspartate et métalloprotéases) dans la protéolyse globale discutée ci-dessus. Des difficultés d'ordre technique nous ont poussé à écarter les résultats concernant les classes des protéases à aspartate et des métalloprotéases.

Le suivi des activités des protéases à cystéine et à sérine a permis de mettre en évidence des implications différentes de ces deux classes de protéases, au cours du développement et en réponse à l'ozone. Les protéases à sérine sont peu affectées par l'ozone, tandis que les protéases à cystéine présentent des activités qui augmentent progressivement à la fois avec l'âge des feuilles et avec la dose d'ozone. En fin d'expérimentation, elles finissent par représenter la classe majoritaire de protéases ([Fig.33-A](#)). Si nous avons été surpris par les faibles proportions d'activités totales mesurées pour cette classe de protéase sur les échantillons provenant des trois premiers prélèvements, en comparaison de ce que la littérature rapporte (Wiśniewski and Zagdańska, 2001; Grudkowska and Zagdańska, 2004), ces résultats restent cohérents avec le rôle généralement attribué aux protéases à cystéine : en effet ces dernières sont connues pour être spécifiquement impliquées dans les mécanismes de remobilisation lors des phénomènes de sénescences, naturels ou induits (Grudkowska and Zagdańska, 2004; Lim et al., 2007)

Les réponses à l'ozone de ces deux classes de protéases indiquent que le maïs, tout en affichant des niveaux d'activités endoprotéolytiques totales peu influencés par l'ozone, connaît d'importantes variations dans l'activité spécifique de ses protéases vacuolaires. A la suite de cette étude les protéases à cystéine apparaissent comme de meilleures candidates au rôle de marqueurs de sénescence en réponse à une exposition à l'ozone que l'activité endoprotéolytiques totale et invite à poursuivre les recherche sur les activités spécifiques.

VII] CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude nous avons cherché à mieux appréhender les conséquences qu'une augmentation des teneurs en ozone troposphérique pourrait avoir sur le rendement de maïs. Il s'agit d'un paramètre intégratif et les lacunes sur sa variabilité en réponse à l'ozone sont importantes. C'est pourquoi nous avons délibérément choisi une approche transversale qui nous a permis d'aborder la question en interrogeant différents niveaux d'intégration et de reconsidérer la sensibilité du maïs à l'ozone.

Contrairement aux attentes des concepteurs de l'expérimentation et contrairement à ce que la littérature laissait présager, les conséquences sur les paramètres de rendement qui ont été mesurés sont pour ainsi dire insignifiantes « agronomiquement ». Ainsi, une grande partie de nos efforts a consisté à explorer différents paramètres physiologiques et biochimiques, dans le but de découvrir quelles pouvaient être les propriétés du maïs responsables de cette absence d'effet. Les différentes techniques utilisées et leurs résultats ont permis d'avancer un certain nombre d'hypothèses sur les processus déclenchés par l'ozone, sans pour autant permettre de proposer d'explications totalement satisfaisantes. Ce qui est sûr néanmoins, c'est que nos conclusions relatives aux conséquences de l'ozone sur le maïs ne sont pas aussi alarmantes que celles tirées des modélisations actuelles. De plus, nos conclusions appellent à une reconsidération de la relation exposition-réponse communément admise actuellement, ainsi qu'à une modification du niveau critique associé à cette relation. Enfin, nos résultats ont montré que le maïs apparaît comme résistant à l'ozone au regard des paramètres de rendement, mais également sensible à l'ozone en fonction de certains paramètres biologiques qui sont perturbés en réponse au polluant. Cette dernière observation laisse présager de véritables pertes de rendement en cas d'expositions à l'ozone plus longues ou/et plus intenses.

Importance du dispositif expérimental

Le premier point sur lequel il semble bon de revenir concerne le dispositif expérimental. L'essentiel des connaissances sur le comportement du maïs en

réponse à l'ozone est tiré d'expérimentations en conditions contrôlées. Si les avantages et les limitations de ce type de protocoles expérimentaux sont connus depuis longtemps, il apparaît primordial de compléter ces études par des expérimentations en champ afin de s'approcher au mieux des conditions « réelles » de culture, en particulier pour les plantes de forts intérêts agronomiques et économiques telles que le maïs. Ceci devrait permettre de proposer des relations dose-réponse plus robustes et donc la mise en place de modèles plus réalistes. Au final, les acteurs du milieu agricole obtiendraient des éléments solides pouvant les aider à des prises de décision raisonnables.

Impact de l'ozone sur la physiologie du maïs

Comme expliqué plus haut, l'absence d'effet observé des traitements à l'ozone sur le rendement n'est pas synonyme d'absence d'effet biologique et un certain nombre de modifications physiologiques et biochimiques sont à noter. La faible conductance stomatique des C_4 est souvent considérée comme le premier argument en faveur de leur tolérance à l'ozone. Il est intéressant de rappeler, en ce qui concerne notre étude, la faible différence entre les plants ayant poussé en condition ambiante et ceux ayant été exposés à l'ozone, pour ce paramètre. Il semble donc que la régulation stomatique ne corresponde pas, chez le maïs, à un mécanisme de défense face à l'ozone. Par conséquent, sa capacité à maintenir des rendements élevés est basée sur des propriétés de tolérance intracellulaires. L'une des conséquences majeures de l'influx d'ozone est la diminution de l'assimilation nette, qui correspond plus à une altération probable de la PEPC qu'à celle de la Rubisco (moins exposée) ou qu'à une diminution des chlorophylles totales (maintenues à un niveau stable tout au long de la période expérimentale). Il semblerait donc qu'une des stratégies du maïs pour maintenir ses niveaux de rendement en réponse à l'ozone, passerait par une préservation des pigments foliaires. Une telle stratégie présente les avantages de préserver la machinerie énergétique de la plante tout en limitant le stress oxydant induit par l'ozone et le stress photo-oxydatif propre à la photosynthèse. Les causes des pertes en protéines foliaires en réponse à l'ozone n'ont pu être clairement déterminées. En effet, ces pertes ne semblent pas être liées uniquement à des augmentations de l'activité endoprotéolytique totale. C'est pourquoi il faut considérer d'autres phénomènes

comme une diminution des activités de synthèse protéique, et/ou l'implication d'autres mécanismes de dégradation protéiques incluant le protéasome 26S, ou plus probablement sa sous-unité 20S.

Impact de l'ozone sur les niveaux d'oxydation des molécules biologiques et sur les teneurs en ROS dans les feuilles

Bien que les valeurs de POD_y obtenues laissent entrevoir de faibles capacités antioxydantes, l'impact de l'ozone sur les protéines et les lipides correspond à une baisse de leur niveau d'oxydation. On ne peut donc pas écarter l'hypothèse d'une prise en charge rapide des éléments oxydés et une sur-activation des enzymes antioxydantes. La SOD en particulier est une bonne candidate pouvant assurer la limitation de la multiplication des groupements carbonyles tout en expliquant l'accumulation des ROS (sous la forme H_2O_2). Une caractérisation précise des niveaux d'activités des enzymes antioxydantes et des teneurs en composés antioxydants non-enzymatiques (ascorbate, tocophérols...) permettrait sans doute d'éclaircir ces observations.

Activités endoprotéolytiques foliaires en réponse à l'ozone

Les activités endoprotéolytiques foliaires totales ne sont pas induites par l'ozone, ce dernier ne faisant qu'exagérer les variations des activités endoprotéolytiques liées à l'avancée en âge des tissus. Toutefois, l'étude de la protéolyse totale complétée par le suivi d'activités spécifiques à certaines classes d'endoprotéases a présenté un intérêt certain. Elle a permis, entre autre, de montrer l'implication croissante des protéases à cystéine dans l'activité endoprotéolytique totale, en réponse à une augmentation de l'intensité du stress et à la durée de l'exposition. Ceci suggère que ce type d'activité protéolytique pourrait constituer un bon indicateur de l'impact de l'ozone sur le maïs.

De plus d'un point de vue méthodologique, cette étude a permis de développer une méthode de suivi en temps réel de la protéolyse. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et reproductible, tout en permettant le suivi simultané des activités endoprotéolytiques totales et spécifiques. La caractérisation

d'autres classes de protéases devrait permettre d'établir rapidement des profils d'activités et ainsi de mieux comprendre le rôle de chaque classe de protéase dans la réponse aux stress.

La conclusion principale de ce travail de thèse reste la mise en évidence de la tolérance du maïs à l'ozone, qui malgré des niveaux conséquents d'exposition, parvient à maintenir son rendement au niveau de celui de plants exposés à des conditions ambiantes d'ozone. Nos observations soulèvent également de nombreuses interrogations quant à la compréhension des raisons de cette tolérance et ouvre de nombreuses perspectives de recherche, que ce soit dans la compréhension de ses mécanismes de défenses ou dans celles des mécanismes de compensation.

VII] BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad R** (2012) Effet de l'ozone troposphérique sur la physiologie des feuilles de maïs (*Zea mays* L.) : étude de gènes impliqués dans le catabolisme cellulaire.
- Ahmad R, Zuily-Fodil Y, Passaquet C, Bethenod O, Roche R, Repellin A** (2012) Ozone and aging up-regulate type II metacaspase gene expression and global metacaspase activity in the leaves of field-grown maize (*Zea mays* L.) plants. *Chemosphere* **87**: 789–795
- Ahmad R, Zuily-Fodil Y, Passaquet C, Bethenod O, Roche R, Repellin A** (2014) Identification and characterization of MOR-CP, a cysteine protease induced by ozone and developmental senescence in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Chemosphere* **108**: 245–50
- Anjum NA, Sofo A, Scopa A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Lukatkin AS, Pereira E, Duarte AC, Ahmad I** (2015) Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ Sci Pollut Res* **22**: 4099–4121
- Ashmore MR** (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell Environ* **28**: 949–964
- Avnery S, Mauzerall DL, Fiore AM** (2013) Increasing global agricultural production by reducing ozone damages via methane emission controls and ozone-resistant cultivar selection. *Glob Chang Biol* **19**: 1285–99
- Avnery S, Mauzerall DL, Liu J, Horowitz LW** (2011a) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O₃ pollution. *Atmos Environ* **45**: 2297–2309
- Avnery S, Mauzerall DL, Liu J, Horowitz LW** (2011b) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. *Atmos Environ* **45**: 2284–2296
- Badu-Apraku B, Hunter R, Tollenaar M** (1983) Effect of temperature during grain filling on whole plant and grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Can J Plant* ... **363**: 357–363
- Bagard M** (2008) Impact de l'ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (*Populus x canescens* [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire.
- Bagard M, Jolivet Y, Hasenfratz-Sauder M-P, Gérard J, Dizengremel P, Le Thiec D** (2015) Ozone exposure and flux-based response functions for photosynthetic

- traits in wheat, maize and poplar. *Environ Pollut* **206**: 411–420
- Bartoli CG** (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* **55**: 1663–1669
- Basset G, Raymond P, Malek L, Brouquisse R** (2002) Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. evidence for an in vivo oxidation of the proteasome. *Plant Physiol* **128**: 1149–1162
- Ben-Asher J, Garcia Y Garcia a., Hoogenboom G** (2008) Effect of high temperature on photosynthesis and transpiration of sweet corn (*Zea mays* L. var. *rugosa*). *Photosynthetica* **46**: 595–603
- Berlett BS** (1997) Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J Biol Chem* **272**: 20313–20316
- Birch CJ, Vos J, Van der Putten PEL** (2003) Plant developement and leaf area production in contrasting cultivars of maize grown in a cool temperature environment in the field. *Eur J Agron* 173–188.
- Black VJ, Stewart C a., Roberts J a., Black CR** (2007) Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol* **176**: 150–163
- Blakeman DP, Ryan TP, Jolly R a, Petry TW** (1998) Protein oxidation: examination of potential lipid-independent mechanisms for protein carbonyl formation. *J Biochem Mol Toxicol* **12**: 185–90
- Bonhomme R** (2000) Bases and limits to using “degree.day” units. *Eur J Agron* **13**: 1–10
- Borrás L, Slafer GA, Otegui ME** (2004) Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *F Crop Res* **86**: 131–146
- Bozaykut P, Sozen E, Kaga E, Ece A, Ozaltin E, Ek B, Ozer NK, Grune T, Bergquist J, Karademir B** (2013) The role of heat stress on the age related protein carbonylation. *J Proteomics* **89**: 238–254
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y -s., Penfold CA, Jenkins D, et al** (2011) High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during *Arabidopsis* Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *Plant Cell* **23**: 873–894
- Çakir R** (2004) Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *F Crop Res* **89**: 1–16
- Caregnato FF, Bortolin RC, Divan Junior AM, Moreira JCF** (2013) Exposure to

- elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties. *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.084
- Castagna a., Ranieri a.** (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environ Pollut* **157**: 1461–1469
- Castagna A, Ederli L, Pasqualini S, Mensuali-Sodi A, Baldan B, Donnini S, Ranieri A** (2007) The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: Causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. *New Phytol* **174**: 342–356
- Cerovic Z, Masdoumier G, Ben Ghazlen N, Latouche G** (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol Plant* 251–260
- Chmielowska-Bak J, Izbińska K, Deckert J** (2015) Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Front Plant Sci* **6**: 6–10
- Dielen A-S, Badaoui S, Candresse T, German-Retana S** (2010) The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. *Mol Plant Pathol* **11**: 293–308
- Van Dingenen R, Dentener FJ, Raes F, Krol MC, Emberson L, Cofala J** (2009) The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. *Atmos Environ* **43**: 604–618
- Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y** (2008) Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environ Pollut* **156**: 11–15
- Djebali W, Gallusci P, Polge C, Boulila L, Galtier N, Raymond P, Chaibi W, Brouquisse R** (2008) Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta* **227**: 625–639
- Domínguez-López D, Adame J a., Hernández-Ceballos M a., Vaca F, De La Morena B a., Bolívar JP** (2014) Spatial and temporal variation of surface ozone, NO and NO₂ at urban, suburban, rural and industrial sites in the southwest of the Iberian Peninsula. *Environ Monit Assess* **186**: 5337–5351
- Dwyer L, Andrews C, Stewart D, Ma D, Dugas J** (1995) Genotypes, Carbohydrate levels in field-grown leafy and normal maize. *Crop Sci* **35**: 1020–1027
- Ehhalt D, Prather M, Dentener F, Al. E** (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. Cambridge Univ Press pp. 239–287
- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, Knight MR** (2005) ROS perception in

- Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant J* **41**: 615–626
- Farré I, Faci JM** (2006) Comparative response of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) to deficit irrigation in a Mediterranean environment. *Agric Water Manag* **83**: 135–143
- Feng Z, Kobayashi K** (2009) Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmos Environ* **43**: 1510–1519
- Feng Z, PANG J, KOBAYASHI K, ZHU J, ORT DR** (2011) Differential responses in two varieties of winter wheat to elevated ozone concentration under fully open-air field conditions. *Glob Chang Biol* **17**: 580–591
- Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO** (2005) Crop responses to ozone : uptake , modes of action , carbon assimilation and partitioning. 997–1011
- Foyer CH, Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* **11**: 861–905
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2–18
- Foyer CH, Valadier MH, Migge a, Becker TW** (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol* **117**: 283–292
- Fuhrer J** (1997) ★1882 Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe.pdf. 97:
- Fuhrer J** (2009) Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* **96**: 173–94
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inzé D, Mittler R, Van Breusegem F** (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 436–445
- Gepstein S** (2004) Leaf senescence--not just a “wear and tear” phenomenon. *Genome Biol* **5**: 212
- Ghannoum O** (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Ann Bot* **103**: 635–644
- Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC** (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* **65**: 45–80
- González-Rábade N, Badillo-Corona JA, Aranda-Barradas JS, Oliver-Salvador MDC** (2011) Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. *Biotechnol Adv* **29**: 983–996

- Grewe V** (2005) The origin of ozone. *Atmos Chem Phys Discuss* **5**: 9641–9668
- Grudkowska M, Zagdańska B** (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol* **51**: 609–624
- Grünhage L, Jäger H-J** (2003) From critical levels to critical loads for ozone: a discussion of a new experimental and modelling approach for establishing flux–response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environ Pollut* **125**: 99–110
- Grünhage L, Jäger HJ, Haenel HD, Löpmeier FJ, Hanewald K** (1999) The European critical levels for ozone: Improving their usage. *Environ Pollut* **105**: 163–173
- Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C** (2013) Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytol* **199**: 683–94
- Gustavsson N, Kokke BP a, Härndahl U, Silow M, Bechtold U, Poghosyan Z, Murphy D, Boelens WC, Sundby C** (2002) A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant J* **29**: 545–553
- Haagen-smit** (1952) Small, Speckled,. 18–34
- Hameed A, Bibi N, Akhter J, Iqbal N** (2011) Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiol Biochem* **49**: 178–185
- Hatfield JL, Boote KJ, Kimball B a, Ziska LH, Izaurralde RC, Ort D, Thomson a M, Wolfe D** (2011) Climate impacts on Agriculture: Implications for Crop Production. *Agron J* **103**: 351–370
- Havé M** (2013) Effets de l’ozone troposphérique sur le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) : caractérisation de l'endoprotéolyse vacuolaire et du niveau d'oxydation des protéines dans la feuille drapeau.
- Havé M, Leitaio L, Bagard M, Castell J-F, Repellin A** (2015) Protein carbonylation during natural leaf senescence in winter wheat, as probed by fluorescein-5-thiosemicarbazide. *Plant Biol* **17**: 973–979
- Hieng B, Ugrinović K, Sustar-Vozlic J, Kidric M** (2004) Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *J Plant Physiol* **161**: 519–30
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK** (1999) Improving the

- thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604–611
- Holland M, Kinghorn S, Emberson L** (Natural Environment Research Council)
CEH Project No . C02309NEW Defra Contract EPG 1 / 3 / 205 Development of a framework for probabilistic assessment of the economic losses caused by ozone damage to crops in Europe. Reading
- van der Hoorn R a L** (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 191–223
- Implications P, Editors R, Buchanan B, Dietz KJ, Pfannschmidt T** (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms. *Regulation* **11**: 861–905
- Iriti M, Faoro F** (2007) Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut* **187**: 285–301
- V. J. Black, C. R. Black, J. a. Roberts C a. S** (2000) Impact of ozone on the reproductive development of plants. *New Phytol* **140**: 385 – 410
- Jenkin ME, Clemitshaw KC** (2002) Chapter 11 Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Dev Environ Sci* **1**: 285–338
- Jin J, Tang C, Sale P** (2015) The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: a review. *Ann Bot.* doi: 10.1093/aob/mcv088
- Johansson E, Olsson O, Nyström T** (2004) Progression and Specificity of Protein Oxidation in the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 22204–22208
- Joo JH, Wang S, Chen JG, Jones AM, Fedoroff N V** (2005) Different Signaling and Cell Death Roles of Heterotrimeric G Protein α and β Subunits in the Arabidopsis Oxidative Stress Response to Ozone. **17**: 957–970
- Junqua M, Biolley J, Pie S, Kanoun M** (2000) In vivo occurrence of carbonyl residues in Phaseolus vulgaris proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. *Plant Physiol Biochem* **38**: 853–861
- Kakani VG, Vu JCV, Allen LH, Boote KJ** (2011) Leaf photosynthesis and carbohydrates of CO₂-enriched maize and grain sorghum exposed to a short period of soil water deficit during vegetative development. *J Plant Physiol* **168**: 2169–2176
- Kampa M, Castanas E** (2008) Human health effects of air pollution. *Environ Pollut* **151**: 362–7
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-

- exposed plants. *Plant, Cell Environ* **28**: 1021–1036
- Kerstiens G, Lenzian KJ** (1989) Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol* **112**: 13–19
- Khanna-Chopra R, Srivalli B, Ahlawat YS** (1999) Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 324–7
- Kim S, Gitz D, Sicher R, Baker J, Timlin D, Reddy V** (2007) Temperature dependence of growth, development, and photosynthesis in maize under elevated CO₂. *Environ Exp Bot* **61**: 224–236
- Kimball B, Kobayashi K, Bindi M** (2002) Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Adv Agron.* doi: 10.1016/S0065-2113(02)77017-X
- Kimball BA** (1983) (1983) Carbon Dioxide and Agricultural Yield: An Assemblage and Analysis of 430 Prior Observations (AJ).
- Koyama T** (2014) The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Front Plant Sci* **5**: 650
- Kress LW, Miller JE** (1985) No Title. *Can J Bot* **63**: 2408–2415
- Kumar a, Venkateswarlu B** (2011) Abiotic Stress Response in Plants. *Physiol , Biochem Genet Perspect.* doi: 10.5772/1762
- Kumari S, Agrawal M, Singh A** (2015) Effects of ambient and elevated CO₂ and ozone on physiological characteristics, antioxidative defense system and metabolites of potato in relation to ozone flux. *Environ Exp Bot* **109**: 276–287
- Kurepa J, Smalle J a** (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* **90**: 324–335
- Landry LG, Pell EJ** (1993) Modification of Rubisco and Altered Proteolytic Activity in O₃-Stressed Hybrid Poplar (*Populus maximowiczii* x *trichocarpa*). *Plant Physiol* **101**: 1355–1362
- Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* **40**: 567–575
- Leakey ADB, Bernacchi CJ, Dohleman FG, Ort DR, Long SP** (2004) Will photosynthesis of maize (*Zea mays*) in the US Corn Belt increase in future [CO₂] rich atmospheres? An analysis of diurnal courses of CO₂ uptake under free-air concentration enrichment (FACE). *Glob Chang Biol* **10**: 951–962
- Leakey ADB, Uribe-larrea M, Ainsworth E a, Naidu SL, Rogers A, Ort DR, Long SP** (2006) Photosynthesis, productivity, and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant Physiol*

140: 779–790

- Leitao L, Delacote E, Dizengremel P, Le Thiec D, Biolley JP** (2007a) Assessment of the impact of increasing concentrations of ozone on photosynthetic components of maize (*Zea mays* L.), a C-4 plant. *Environ Pollut* **146**: 5–8
- Leitao L, Dizengremel P, Biolley J-P** (2008) Foliar CO₂ fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotoxicol Environ Saf* **69**: 531–540
- Leitao L, Goulas P, Biolley J-P** (2003) Time-course of Rubisco oxidation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to a long-term ozone stress. *Plant Sci* **165**: 613–620
- Leitao L, Maoret JJ, Biolley JP** (2007b) Changes in PEP carboxylase, Rubisco and Rubisco activase mRNA levels from maize (*Zea mays*) exposed to a chronic ozone stress. *Biol Res* **40**: 137–153
- LI C, TAO Z, LIU P, ZHANG J, ZHUANG K, DONG S, ZHAO M** (2015) Increased grain yield with improved photosynthetic characters in modern maize parental lines. *J Integr Agric* **14**: 1735–1744
- Li T, Liu L-N, Jiang C-D, Liu Y-J, Shi L** (2014) Effects of mutual shading on the regulation of photosynthesis in field-grown sorghum. *J Photochem Photobiol B* **137**: 31–8
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H** (2007) Leaf Senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115–136
- Lodyga M, Polan A, Skotarczak K, Mazur M, Adamski Z** (2015) Photoprotection : facts and controversies. 98–112
- Long SP, Ainsworth E a, Leakey ADB, Morgan PB** (2005) Global food insecurity. treatment of major food crops with elevated carbon dioxide or ozone under large-scale fully open-air conditions suggests recent models may have overestimated future yields. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 2011–2020
- Markelz RJC, Strellner RS, Leakey ADB** (2011) Impairment of C4 photosynthesis by drought is exacerbated by limiting nitrogen and ameliorated by elevated [CO₂] in maize. *J Exp Bot* **62**: 3235–3246
- Martín M, Distefano A, Zabaleta E, Pagnussat G** (2013) New insights into the functional roles of reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **8**: 1–5
- Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ** (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *J Exp Bot* **58**: 1099–107

- Martínez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaría ME, Díaz I** (2012) C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiol Plant* **145**: 85–94
- McLeod AR, Long SP** (1993) Free air carbon dioxide enrichment (FACE) in global change research: a review. *Adv Ecol Res* **28**: 1–55
- Mills G, Buse a., Gimeno B, Bermejo V, Holland M, Emberson L, Pleijel H** (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmos Environ* **41**: 2630–2643
- Mills G, Hayes F, Wilkinson S, Davies WJ** (2009) Chronic exposure to increasing background ozone impairs stomatal functioning in grassland species. *Glob Chang Biol* **15**: 1522–1533
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 459–481
- Møller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RSP** (2011) Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics* **74**: 2228–2242
- Møller IM, Sweetlove LJ** (2010) ROS signalling – specificity is required. *Trends Plant Sci* **15**: 370–374
- Muchow RC** (1989) Comparative productivity of maize, sorghum and pearl millet in a semi-arid tropical environment II. Effect of water deficits. *F Crop Res* **20**: 207–219
- Mulchi C, Rudorff B, Lee E, Rowland R, Pausch R** (1995) Morphological responses among crop species to full-season exposures to enhanced concentrations of atmospheric CO₂ and O₃. *Water Air Soil Pollut* **85**: 1379–1386
- Mulholland BJ, Craigon J, Black CR, Colls JJ, Atherton J, Landon G** (1997) Effects of elevated carbon dioxide and ozone on the growth and yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* **48**: 113–122
- Mulholland BJ, Craigon J, Black CR, Colls JJ, Atherton J, Landon G** (1998) Effects of elevated CO₂ and O₃ On the rate and duration of grain growth and harvest index in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Glob Chang Biol* **4**: 627–635
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2004) Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct Plant Biol* **31**: 203–216
- Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F** (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* **65**: 1575–1582
- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J** (2003) Reactive oxygen species and

hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**: 335–342

- Overmyer K, Kollist H, Tuominen H, Betz C, Langebartels C, Wingsle G, Kangasjärvi S, Brader G, Mullineaux P, Kangasjärvi J** (2008) Complex phenotypic profiles leading to ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell Environ* **31**: 1237–49
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F** (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* **133**: 1122–1134
- Pearson M** (1995) Effects of ozone on growth and gas exchange of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tree Physiol* **15**: 207–10
- Pleijel H, Danielsson H, Gelang J, Sild E, Selldén G** (1998) Growth stage dependence of the grain yield response to ozone in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agric Ecosyst Environ* **70**: 61–68
- Polge C, Jaquinod M, Holzer F, Bourguignon J, Walling L, Brouquisse R** (2009) Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the Proteasome Proteolytic Pathway: ACTIVATION IN RESPONSE TO CADMIUM. *J Biol Chem* **284**: 35412–35424
- Prins A, Mukubi JM, Pellny TK, Verrier PJ, Beyene G, Lopes MS, Emami K, Treumann A, Lelarge-Trouverie C, Noctor G, et al** (2011) Acclimation to high CO₂ in maize is related to water status and dependent on leaf rank. *Plant Cell Environ* **34**: 314–331
- Pyngrope S, Bhoomika K, Dubey RS** (2012) Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in *Indica* rice seedlings. *Plant Growth Regul* **69**: 149–165
- Qiu Q-S, Huber JL, Booker FL, Jain V, Leahey ADB, Fiscus EL, Yau PM, Ort DR, Huber SC** (2008) Increased protein carbonylation in leaves of *Arabidopsis* and soybean in response to elevated [CO₂]. *Photosynth Res* **97**: 155–66
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN** (2014) Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci* **1312**: 105–112
- Rao M V., Davis KR** (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J* **17**: 603–614
- Rawlings ND, Barrett a. J, Bateman a.** (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **38**: D227–D233
- Rellán-Álvarez R, Ortega-Villasante C, Álvarez-Fernández A, Campo FF Del, Hernández LE** (2006) Stress Responses of *Zea mays* to Cadmium and Mercury. *Plant Soil* **279**: 41–50

- Roberts MJ, Long SP, Tieszen LL, Beadle CL** (1993) Measurement of plant biomass and net primary production of herbaceous vegetation. Photosynth Prod a Chang Environ a F Lab manua 1–21
- Rudorff BFT, Mulchi CL, Lee EH, Rowland R, Pausch R** (1996) No Title. Environ Pollut **94**: 53–60
- Ruiz-Vera UM, Siebers MH, Drag DW, Ort DR, Bernacchi CJ** (2015) Canopy warming caused photosynthetic acclimation and reduced seed yield in maize grown at ambient and elevated [CO₂]. Glob Chang Biol. doi: 10.1111/gcb.13013
- Sage RF, Kubien DS** (2007) The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. Plant, Cell Environ **30**: 1086–1106
- Sage RF, Stata M** (2015) Photosynthetic diversity meets biodiversity: The C4 plant example. J Plant Physiol **172**: 104–119
- Sanderson JB, M., Daynard TB, Tollenaar** (1981) A mathematical model of the shape of corn leaves. Can J Plant Sci 1009–1011.
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, Dellapenna D** (2003) Characterization of Tocopherol Cyclases from Higher Plants and Cyanobacteria . Evolutionary Implications for Tocopherol Synthesis and Function. Plant Physiol **132**: 2184–2195
- Schlenker W, Roberts MJ** (2009) Nonlinear temperature effects indicate severe damages to U.S. crop yields under climate change. Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 15594–15598
- Shacter E** (2000) Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples*. Drug Metab Rev **32**: 307–326
- Siddharth Kaushal Tripathi NT** (2007) Integrated Signaling in Flower Senescence. 437–445
- Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U** (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. Plant Physiol Biochem **48**: 200–6
- Singh AA, Agrawal SB, Shahi JP, Agrawal M** (2014a) Assessment of growth and yield losses in two Zea mays L. cultivars (quality protein maize and nonquality protein maize) under projected levels of ozone. Environ Sci Pollut Res Int **21**: 2628–41
- Singh AA, Agrawal SB, Shahi JP, Agrawal M** (2014b) Investigating the response of tropical maize (Zea mays L.) cultivars against elevated levels of O₃ at two developmental stages. Ecotoxicology **23**: 1447–1463
- Smakowska E, Czarna M, Janska H** (2014) Mitochondrial ATP-dependent

- proteases in protection against accumulation of carbonylated proteins. Mitochondrion **19**: 245–251
- Solberg S, Bergstrom R, Langner J, Laurila T, Lindskog a** (2005) Changes in Nordic surface ozone episodes due to European emission reductions in the 1990s. Atmos Environ **39**: 179–192
- Sun L, Su H, Zhu Y, Xu M** (2012) Involvement of abscisic acid in ozone-induced puerarin production of *Pueraria thomsnii* Benth. suspension cell cultures. Plant Cell Rep **31**: 179–185
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. Curr Opin Plant Biol **14**: 691–699
- Tamaoki M** (2008) The role of phytohormone signaling in ozone - induced cell death in plants by Ozone. **3**: 166–174
- The Royal Society** (2008) Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications.
- Thomas H, Stoddart JL** (1980) LEAF SENESCENCE +7685. Plant Breed **83**: 111
- Tollenaar M, Lee E a.** (2002) Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. F Crop Res **75**: 161–169
- Tosti N, Pasqualini S, Borgogni A, Ederli L, Falistocco E, Crispi S, Paolocci F** (2006) Gene expression profiles of O₃-treated Arabidopsis plants. Plant, Cell Environ **29**: 1686–1702
- Troyer AF** (2006) Adaptedness and heterosis in corn and mule hybrids. Crop Sci **46**: 528–543
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavalov A, Lam E, Bozhkov P V** (2011) Metacaspases. Cell Death Differ **18**: 1279–1288
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. Plant J **39**: 59–69
- Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, et al** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. Plant J **62**: 442–453
- Vainonen JP, Kangasjärvi J** (2015) Plant signalling in acute ozone exposure. Plant Cell Environ **38**: 240–252
- Vierstra RD** (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Mol Biol **32**: 275–302

- Vingarzan R** (2004) A review of surface ozone background levels and trends. *Atmos Environ* **38**: 3431–3442
- Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, Dudgeon D, Prusevich a, Green P, Glidden S, Bunn SE, Sullivan C a, Liermann CR, et al** (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **467**: 555–561
- Wagstaff C, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead AD, Rogers HJ** (2002) Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *J Exp Bot* **53**: 233–40
- Wilkinson S, Davies WJ** (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ* **33**: 510–25
- Wilkinson S, Davies WJ** (2009) Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell Environ* **32**: 949–959
- Wilkinson S, Mills G, Illidge R, Davies WJ** (2012) How is ozone pollution reducing our food supply? *J Exp Bot* **63**: 527–36
- Wiśniewski K, Zagdańska B** (2001) Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J Exp Bot* **52**: 1455–63
- Wittig VE, Ainsworth E a., Long SP** (2007) To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant Cell Environ* **30**: 1150–1162
- World Health Organization** (2013) Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project. 309
- World Meteorological Organization (WMO)** (2014) Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2014.
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC** (2006) Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**: 291–299
- Xu E, Vaahtera L, Brosché M** (2015) The Role of Defense Hormones in Regulation of Ozone-Induced Changes in Gene Expression and Cell Death. *Mol Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2015.08.008
- Yoshida S, Tamaoki M, Ioki M, Ogawa D, Sato Y, Aono M, Kubo A, Saji S, Saji H, Satoh S, et al** (2009) Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **136**: 284–298

Impact sur les paramètres agronomiques et physiologiques de l'ozone
troposphérique sur le maïs en Ile-de-France

Résumé : L'augmentation des concentrations de fond en ozone dans la troposphère depuis le XX^{ème} siècle est responsable de baisses conséquentes des rendements des grandes cultures. Le maïs ne semble pas épargné et les pertes de rendement pour l'année 2000 seraient de l'ordre de 2,2% à 5%. Toutefois, ces estimations sont établies à partir des résultats d'un nombre très faible d'expérimentations, toutes réalisées en chambres d'ozonation à ciel ouvert. Afin de vérifier si ces projections sont véritablement transposables aux champs de maïs cultivé en conditions conventionnelles, des plants de la variété NK Perform ont été mis en culture et exposés en champ à différentes concentrations d'ozone, en conditions semi-contrôlées. Pendant le développement des plantes, des séries d'échantillons ont été prélevées afin de comprendre comment le stress oxydatif, potentiellement induit par l'ozone, pourrait les avoir affectées. Ainsi les niveaux d'activités endoprotéolytiques des feuilles de l'épi (précédemment proposés comme indicateurs du degré de contrainte hydrique) ont été mesurés à l'aide d'une méthode par fluorescence (nouvellement adaptée chez les plantes). Parallèlement, les variations des teneurs en protéines oxydées (groupements carbonyles), de la peroxydation lipidiques et de la teneur en espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont également été analysées. Nos résultats mettent en évidence une stimulation des activités endoprotéolytiques en réponse aux niveaux élevés d'exposition à l'ozone, ainsi qu'une différence significative de teneurs en protéines oxydées entre les plants contrôles et les plants les plus exposés. De mêmes les teneurs en ROS et les niveaux de peroxydation lipidique témoignent d'un effet de l'exposition à l'ozone. Toutes ses réponses cellulaires sont également influencées par l'âge des tissus foliaires. Ces résultats semblent abonder dans le sens des modèles en démontrant un impact certain de l'ozone sur le maïs, cependant toutes les analyses menées sur les paramètres de rendement (poids de mille grains, biomasse, teneur en amidon...) ne laisse entrevoir aucune perte, nous obligeant alors à reconsidérer la sensibilité du maïs à l'ozone, généralement admise jusqu'ici.

Abstract :For the past 150 years, background tropospheric ozone concentrations have been increasing constantly to the point where they now affect grain yield in major cereals, such as maize. In 2000, it has been estimated that yield loss was between 2.2% and 5% in this crop. Such estimates have been established from a very low number of experiments, all carried out in open top ozone fumigation chambers. To verify the accuracy of these estimations, we cultivated maize plants and exposed them to various ozone concentrations in the field. During plant development, series of cob-leaf samples have been collected in order to analyze the impact of ozone-induced oxidative stress on various biochemical processes. Thus, we studied changes in leaf endoproteolytic activities (a parameter previously used as a dehydration stress indicator), using a fluorescence-based method newly adapted to plant tissues. Concurrently, changes in protein oxidation levels (carbonyl groups) were analyzed, along with lipid peroxidation and accumulation of reactive oxygen species (ROS). Our results indicate that ozone induced increases in the global level of protein oxidation, endoproteolytic processes and lipid peroxidation, most likely as a result of an over-accumulation of ROS in the leaf tissues. Furthermore, the impact of ozone is enhanced by aging. To some extent, these conclusions agree with those obtained from impact modeling that also show that maize is mildly sensitive to ozone. However, because yield was not affected whatsoever in our experiment (1000 grain weight, biomass, starch accumulation), it is our opinion that the general consensus about the sensitivity of maize to ozone should be revised.