

Effets anatomiques de l'ozone sur le térébinthe (*Pistacia terebinthus*)

par Francisco José GARCÍA-BREIJO, José REIG-ARMIÑANA,
Belén BAUTISTA-PERIS, Vicent CALATAYUD, Julia CERVERÓ,
Maria José SANZ

Cet article, écrit par des chercheurs espagnols de Valence, décrit les changements anatomiques produits sur les feuilles de térébinthe, arbuste méditerranéen, soumises à différents niveaux d'exposition à l'ozone. On note une grande variabilité de réactions en fonction du stade de développement. Ainsi, des expositions à l'ozone effectuées sur différentes années peuvent produire des lésions visibles, pour des doses d'ozone très différentes.

Introduction

L'ozone troposphérique a presque doublé depuis les temps pré-industriels (HOUGHTON *et al.*, 1996). Actuellement, dans les zones rurales européennes, ce polluant tend légèrement à augmenter (FIALA & *al.* 2003). Certains des plus hauts niveaux ont été enregistrés en région méditerranéenne (SANZ *et al.* 2007), où l'intense radiation solaire, les températures élevées et la recirculation des masses d'air polluées favorisent sa formation (MILLÁN *et al.* 1997, 2000, SANZ et MILLÁN 1998). Pour des espèces indigènes sensibles, de tels niveaux ambiants d'ozone peuvent produire des séries de transformations physiologiques et anatomiques pouvant aboutir à des réductions de croissance et de rendement (e.g., CHAPPELKA & CHEVONE 1992) et/ou produire des lésions visibles (e.g., INNES *et al.* 2001, SANZ *et al.* 2001).

Les effets de l'ozone sur les espèces méditerranéennes ont été à peine étudiés. Les niveaux d'ozone les plus élevés sont mesurés en été (SANZ *et al.* 2007), une période lors de laquelle les plantes peuvent subir une réduction de la conductance stomatique, résister à la sécheresse et, par conséquent, limiter l'absorption d'ozone. Cependant, les espèces de pins ont montré une certaine sensibilité : développement de lésions visibles à des niveaux d'ozone ambiants dans différents secteurs méditerranéens, par exemple pour *Pinus halepensis* (BARNES *et al.* 1999, SANZ *et al.* 2000) et pour *Pinus cembra* (DALSTEIN & VAS 2005).

Les espèces persistantes sont en général relativement tolérantes au polluant, même si un affaiblissement du réseau photosynthétique, une augmentation des niveaux d'antioxydant, des altérations anatomiques, un ralentissement de la croissance des tiges et également des lésions visibles, ont été constatés parmi différentes espèces lors d'expériences de fumigation (par exemple ELVIRA *et al.* 2003, INCLÁN *et al.* 1999, MANES *et al.* 1998, NALI *et al.* 2004, PAOLETTI *et al.* 2003, REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004, RIBAS *et al.* 2005). Jusqu'ici, très peu de données sont disponibles sur les arbustes à feuilles caduques en région méditerranéenne.

Dans cet article, les effets de l'ozone sont étudiés sur l'une de ces espèces : le *Pistacia terebinthus* (térébinthe). Le *Pistacia terebinthus* est un arbuste à feuilles caduques, parfois même un petit arbre, avec des feuilles composées formées par des folioles ellipsoïdales et au rachis terminé par une unique foliole. Ce pistachier est réparti sur tout le pourtour méditerranéen. Dans la péninsule ibérique, il pousse généralement dans les forêts peu denses de chênes et de hêtres et dans les formations de maquis. Il est moins résistant à la sécheresse que son homologue persistant, le *Pistacia lentiscus* (arbre à mastic), préférant des espaces plus humides. Le *P. terebinthus* est caractérisé par sa haute teneur en tanins et résines, particulièrement en monoterpènes, sesquiterpènes et monoterpénols. Sa richesse en terpènes fait qu'il est utilisé dans la production d'essence de térébenthine.

Les effets de l'ozone sur l'anatomie foliaire et l'histologie du *P. terebinthus* sont décrites ci-après. Ce travail peut être considéré comme complémentaire à celui dans lequel les transformations anatomiques provoquées par l'ozone sur l'arbuste persistant *P. lentiscus* ont été décrites (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004). Afin de caractériser ces transformations, des feuilles de plantes croissant sous air filtré (presque sans ozone, échantillon témoin) sont comparées à des feuilles de plantes croissant sous air enrichi en ozone, suivant deux traitements : NF+40 (ozone modéré) et NF+80 (ozone élevé). Les feuilles marquées ont été suivies depuis le début. Parallèlement, le *Pistacia lentiscus* a été fumigé (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004) ; ainsi, la durée et l'intensité des changements observés pourront être comparés. Les effets physiologiques de l'ozone sur ces deux espèces de *Pistacia* ont également été étudiés lors d'une expérimentation OTC¹ ultérieure menée en

2005, cette dernière fera l'objet d'un autre article. De cette étude, on peut conclure que le développement de lésions visibles, ainsi que les mesures physiologiques, indiquent clairement que le *Pistacia terebinthus* est beaucoup plus sensible à l'ozone que le *P. lentiscus*.

Matériel et méthodes

Le matériel "plante"

Les plants de *Pistacia terebinthus*, issus de graines provenant d'une pépinière régionale (Viveros Todolí, Alicante, Espagne) ont été placés sous air filtré durant 14 mois, avant d'être soumis aux expositions. Les plants se sont développés dans 71 containers remplis à 60% de tourbe blonde, 20% de tourbe de coco et 20% de sable (pH ~ 7.0). Un fertilisant à libération lente² a été incorporé. Les plantes ont été arrosées régulièrement pour éviter le stress hydrique.

Taux d'ozone appliqués

L'étude a été menée à "La Peira"³, dans une zone rurale à 20 km au sud de Valencia (est de l'Espagne). L'expérience a été réalisée au moyen de trois chambres à ciel ouvert OTC de type NCLAN (National Crop Loss Assessment Network, US.EPA). La qualité de l'air dans les chambres, ainsi qu'à l'extérieur, a été mesurée de manière continue à l'aide d'analyseurs d'ozone⁴ et d'oxydes d'azote⁵ calibrés régulièrement. De plus, les variables météorologiques basiques ont été mesurées en continu (température, radiation solaire, précipitations, direction et vitesse du vent). Les plantes ont été soumises à trois traitements distincts :

- air filtré au charbon actif (CF),
- air non filtré + 40 ppb O₃ (NF+40),
- air non filtré + 80 ppb O₃ (NF+80).

La fumigation s'est déroulée du 29 mai au 7 octobre 2002, 8 heures par jour (de 10h00 à 18h00), sept jours par semaine. L'ozone a été produit à partir d'oxygène à l'aide d'un générateur à décharges électriques de haut-voltage (SIR S.A.).

En plus des concentrations d'ozone moyennes sur 24 heures (0h00 - 24h00) et sur 12 heures (8h00 - 20h00), l'exposition cumulée à des concentrations d'ozone supérieures à 40 ppb (AOT40, FUHRER *et al.* 1997) a été calculée à partir des concentrations

1 - OTC : Open-top Chambers (chambres à ciel ouvert)

2 - Osmocote plus, N:P:K 15:12:13 + addition de micro-nutriments

3 - Benifaió, 39°16'14.8"N, 00°26'59.6"W, altitude 30 m

4 - Dasibi 1008-AH, Environmental Corp

5 - Dasibi 2108, Environmental Corp.

horaires d'ozone diurnes pour lesquelles la radiation solaire était supérieure à 50 Wm⁻² (voir tableau 1 dans REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004).

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse microscopique

Les échantillons de feuilles destinés à l'analyse microscopique ont été collectés avant exposition (20 mai 2002), et ensuite chaque semaine après le début de l'exposition, excepté à la fin de l'exposition, lorsque l'échantillonnage était fait toutes les deux ou trois semaines. Le traitement des échantillons avant analyse microscopique est décrit précisément dans l'encadré ci-dessous.

Résultats

Concentrations d'ozone

Sur la période de fumigation (du 29 mai 2006 au 7 octobre 2002), la moyenne des concentrations journalières (moyennées sur 24 heures) a été de :

- 12,4 ppb (CF),
- 36,7 ppb (NF+40),
- 46,0 ppb (NF+80).

La moyenne des concentrations moyennées sur 12 heures (8h00 - 20h00) a été de :

- 12,4 ppb (CF),
- 59,1 ppb (NF+40),
- 78,8 ppb (NF+80).

A la fin de l'expérience, la valeur d'AOT 40 a atteint 39 670 ppb.h pour le traitement NF+40 et 64730 ppb.h pour le traitement NF+80.

Une information plus détaillée sur les concentrations moyennes et sur les valeurs d'AOT pour chaque jour d'échantillonnage peut être obtenue en consultant le tableau 1 de REIG-ARMIÑANA *et al.* (2004).

Modifications dues à l'ozone

Les feuilles de ces espèces présentent un épiderme recouvert d'une cuticule plus ou moins ornementée. Les cellules uniformes, cylindriques, perpendiculaires à la surface de la feuille forment le parenchyme palissadique. Le parenchyme spongieux est composé de plusieurs couches de cellules arrondies avec des espaces intercellulaires

relativement larges. Il est séparé du parenchyme palissadique par une transition parenchymateuse (Cf. Fig. 1A). Les faisceaux vasculaires de premier et de second ordre sont bicollatéraux, ceux des ordres suivants sont collatéraux, avec le xylème en position adaxiale⁶. Dans les faisceaux vasculaires les plus importants, les canaux sécréteurs se forment entre les cellules du phloème. Les stomates de type anomocytique (c'est-à-dire avec des cellules protectrices, mais sans cellules subsidiaires) deviennent abondants dans l'épiderme inférieur.

Les cellules épidermiques contenaient peu d'organelles et les jeunes feuilles présentaient un contenu vacuolaire de nature tanique, dans les cellules épidermiques adaxiales (Cf. Fig. 1B), qui disparaissait sur les plantes exposées à l'ozone lorsque les feuilles devenaient plus âgées. Après un mois, les plantes ayant subi les deux traitements avec augmentation d'ozone (NF+40, NF+80) montraient un léger accroissement de la cuticule et une ornementation moins marquée par rapport aux feuilles témoins.

Les modifications dues à l'ozone ont été en premier observées sur le parenchyme palissadique. Les cellules des feuilles témoins étaient serrées, avec presque aucun espace entre elles (Cf. Fig. 1A). Elles présentaient d'importantes vacuoles renfermant un contenu dense et homogène, plus vraisemblablement de nature tanique, révélé par son attirance au safranin (Cf. Fig. 1A). Les chlo-

6 - Adaxial : dont la direction est la même que celle de l'axe.

Le traitement des échantillons avant analyse microscopique

Les échantillons de feuilles ont été fixés *in situ* avec de l'alcool formyl acétique. Après lavage avec un tampon phosphate à 0.1 M (pH 7.4), ils ont été deshydratés au moyen d'applications successives d'éthanol. Certains échantillons ont ensuite été fixés dans de la cire de paraffine (Histosec, Merck), avec un point de fusion à 56-58°C; de l'acétate d'isoamyl a été utilisé comme solvant intermédiaire entre l'éthanol et la paraffine. Le temps d'infiltration a été de 30 minutes et la température de 60°C. Les blocs résultants ont ensuite été coupés en sections de 8 mm avec un microtome Anglia Scientific et teinté avec de la safranine et du « fast green » (JOHANSEN, 1940). D'autres échantillons ont été fixés dans de la résine acrylique LR-White de concentration moyenne (London Resin Co.). Le sectionnement des blocs a été réalisé avec un ultramicrotome Sorvall MT 5000 (Knifemaker, Reichert-Jung) muni de lames spéciales utilisées habituellement pour la découpe du verre (45°) (Leica 6.4 mm Glass Strips). Ce microtome a permis l'obtention de sections semi-fines (1.5 mm). Ces échantillons ont été teints avec du bleu de toluidine (1%). La callose a été détectée par microscopie à fluorescence après teinture à l'aniline bleue. Les sections ont été observées et photographiées à l'aide d'un microscope optique Olympus Provis AX 70 équipé d'un appareil photo Olympus Camedia C-2000 Z.

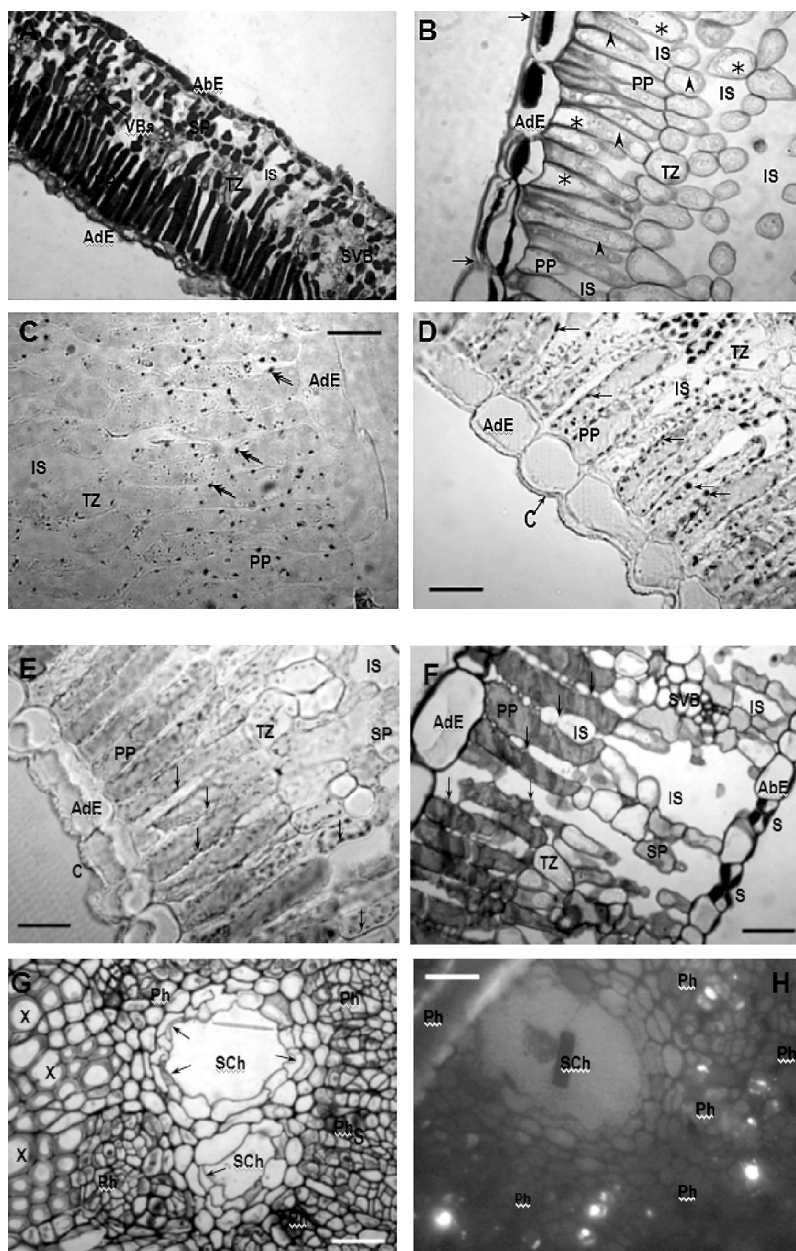


Fig.1 : Sections transversales de feuilles.

- A)** Feuille mature teintée de fast green et de safranin (Traitement CF ; x 400) ; cellules de la barrière du parenchyme (PP), parenchyme spongieux (SP) et épiderme abaxial contenant une abondance de tanins dans les vacuoles, excepté ceux de la zone de transition (TZ) et de l'épiderme adaxial (AdE).
- B)** Jeune feuille dans du bleu cresyl (CF ; x1000) ; dans la barrière du parenchyme, les vacuoles (*) ne présentent pas l'aspect dense des feuilles matures, et les parois cellulaires sont lisses ; les chloroplastes sont abondants (pointes des flèches) et quelques espaces intercellulaires sont observés (IS).
- C)** Feuille mature teintée avec du Lugol (4 semaines sous CF ; x 1000) ; l'amidon (flèches) est accumulé dans les chloroplastes de la barrière du parenchyme (PP).
- D)** Feuille mature dans du Lugol (4 semaines sous traitement NF+40 ; x1000) ; accumulation d'une grande quantité d'amidon (flèches ; en comparaison avec l'échantillon témoin, Fig C dans les chloroplastes du parenchyme palissadique (PP).
- E)** Feuille mature dans du Lugol (4 semaines sous traitement NF+80 ; x1000) ; Les accumulations d'amidon (flèches) ont en majeure partie disparu dans les cellules du parenchyme palissadique (PP), et sont également moins prononcées dans les cellules de la zone de transition (TZ).
- F)** Feuille mature dans du bleu de toluidine (4 semaines sous traitement NF+80 ; x1000) ; le contenu vacolaire des cellules du parenchyme palissadique (PP) présente un aspect de bandes avec des teintes différentes, les parois sont altérées (flèches), les espaces intercellulaires (IS) augmentent au sein du parenchyme palissadique (PP) et du parenchyme spongieux (SP) ; les parois tangentielles internes des cellules occlusives des stomates (S) s'épaississent.
- G)** Feuille mature avec bleu de toluidine (4 semaines sous traitement NF+40 ; x1000) ; les cellules du Phloème (Ph) entourent deux canaux sécréteurs (SC) ; le contenu des cellules du phloème devient plus dense, et certaines cellules sont remplies de tanins ; les cellules longeant le canal sécréteur lumen ne sont pas turgescentes et certaines sont dégradées (flèches).
- H)** Dépôt de callose dans le phloème (points blancs fluorescents) (4 semaines sous traitement NF+40 ; x1000).

Abréviations : AbE : épiderme abaxial ; AdE : épiderme adaxial ; C : cuticule ; IS : espace intercellulaire ; PP : barrière du parenchyme ; Ph : phloème ; S : stomate ; SVB : faisceau vasculaire secondaire ; TZ : zone de transition ; VBS : faisceaux vasculaires ; X : xylème.

roplastes étaient relativement abondants et contenaient une faible accumulation d'amidon (Cf. Fig. 1C). Après trois semaines sous traitement NF+40, la dimension des chloroplastes était nettement réduite et après cinq semaines, certains d'entre eux furent complètement détruits. Le traitement NF+80 faisait avancer le processus d'une semaine. Le contenu vacolaire devenait plus hétérogène que dans les vacuoles des feuilles témoins. A des doses d'ozone plus élevées, la quantité de tanin semblait croître et les vacuoles prenaient l'aspect caractéristique de bandes (Cf. Fig. 1F).

La présence de bandes plus sombres a suggéré une accumulation ou précipitation de tanins dans ces zones. Durant plusieurs semaines (approximativement après la deuxième semaine et jusqu'à la cinquième semaine sous traitement NF+40), l'amidon avait augmenté dans les chloroplastes comparativement avec les feuilles témoins (comparaison Fig. 1C – témoin - avec 1D - NF+40). Avec des temps d'exposition plus importants, l'amidon contenu dans les chloroplastes a diminué parallèlement à la dégénérescence de ces derniers et à leur réduction en nombre. Une telle diminution de l'amidon a été accéléré par le traitement NF+80 (Cf. Fig. 1E : l'amidon a disparu des cellules du parenchyme palissadique après trois semaines d'exposition). Les parois cellulaires ont également subi des altérations impressionnantes. Dans les feuilles témoins, les cellules adjacentes du parenchyme palissadique étaient habituellement en contact sur une partie importante de leur paroi cel-

lulaire, unies entre elles par la lamelle centrale (première couche formée pendant la division de cellules qui compose le mur externe de la cellule et est partagée par les cellules adjacentes. Elle est constituée de composés pectiques et de protéines).

Suite au traitement à l'ozone, la lamelle centrale de ces cellules a été en partie détruite, si bien que les cellules adjacentes sont devenues plus éloignées et les espaces intercellulaires augmentés. Un épaississement des fibres du matériel pectique a été observé, formant des ponts entre les cellules adjacentes (Cf. Fig. 1FA). Certains d'entre eux représentent très probablement les restes d'une zone de jonction antérieure importante, c'est-à-dire les zones où la couche centrale n'a pas encore été détruite.

Le parenchyme spongieux était constitué de deux ou trois couches de cellules lobuleuses, possédant des espaces intercellulaires importants entre elles. Les cellules présentaient un contenu tanique vacuolaire dense, qui avait tendance à croître au sein des feuilles plus âgées. Le cytoplasme restant, situé autour de la cellule, était riche en organelles. Les chloroplastes étaient de petite taille et tendaient à décroître en nombre au sein des cellules les plus âgées ; l'amidon était presque absent dans les feuilles témoins. Après plusieurs semaines sous NF+40, le parenchyme spongieux montrait rapidement des modifications dans les vacuoles qui commençaient à prendre l'aspect en lanières mentionné ci-dessus, indicateur d'un contenu hétérogène. Les chloroplastes subissaient des transformations similaires à ceux situés dans le parenchyme palissadique, mais de manière moins rapide : réduction de leur taille avant d'être complètement détruits.

A la fin, les vacuoles étaient désintégrées et leur contenu était mélangé avec le cytoplasme. Les parois cellulaires devenaient plus irrégulières et détériorées ; comme dans le parenchyme palissadique. Dans certaines zones, des protusions pectineuses ou des fibres pectineuses épaissies ont été observées entre les cellules. Les espaces intercellulaires devenaient plus grands (Cf. Fig. 1F). Comme dans le parenchyme palissadique, l'amidon était initialement accumulé dans les chloroplastes, pour disparaître plus tard sous de fortes concentrations d'ozone (NF+80) ou de longues périodes d'exposition.

Les cellules de la transition parenchymateuse étaient réunies en trois couches et organisées de façon irrégulière dans le méso-

phyle, avec des espaces intercellulaires importants autour d'elles (Cf. Fig. 1D). Elles ne montraient pas la moindre concentration de tanin dans les vacuoles (Cf. Fig. 1A). Les chloroplastes abondants étaient présents, répartis autour de la périphérie du cytoplasme (Cf. Fig. 1D) ; ils n'avaient presque pas accumulé d'amidon (Cf. Fig. 1C). Après deux semaines sous le plus fort traitement à l'ozone, ou après cinq semaines sous le plus faible, il y avait une réorganisation des chloroplastes remplis d'amidon qui se déplaçaient vers la partie centrale de la cellule, probablement dû à la désintégration de la vacuole centrale.

Le métaxylème subissait un accroissement considérable de l'épaisseur de sa paroi et une réduction du vaisseau lumen. La forme des cellules du phloème devenait plus irrégulière, les parois devenaient sinueuses et légèrement épaissies, le dépôt de callose augmentait (Cf. Fig. 2H), et le lumen était considérablement réduit (Cf. Fig. 2G). En comparant avec l'échantillon témoin, les cellules plus proches du canal sécréteur lumen des feuilles exposées à l'ozone prenaient une forme irrégulière et certaines dégénéraient (Cf. Fig. 2G).

Lésion foliaire

Les doses d'ozone requises pour l'apparition des symptômes variaient considérablement parmi ces espèces. En 2000, les plants de térébinthe exposés à des niveaux importants d'ozone, montraient des lésions clairement visibles après seulement un jour d'exposition (traitement NF+80 ppb, AOT 40 = 913 ppb*h ; moyenne sur 12 heures [8h00 - 20h00] = 70 ppb). Cette année-là, les symptômes étaient caractéristiques d'une réponse hypersensible, avec d'abord l'apparition de points marrons (zones nécrotiques comprenant des cellules détériorées), puis jaunissement des feuilles suggérant un vieillissement accéléré (SANZ *et al.* 2001). Les plants de la même population, maintenus dans de l'air filtré depuis l'an 2000, étaient exposés à nouveau en 2002, mais aucun symptôme clairement visible n'a été remarqué cette année là, en dépit des altérations anatomiques et histologiques observées et décrites dans ce document.

En 2002, deux expositions à l'ozone différentes ont été utilisées : NF+40 ppb et NF+80 ppb, avec des valeurs d'AOT40 > 60000 ppb*h, et la moyenne sur 12 h = 78.8 lors du plus haut régime d'ozone, à la fin des

7 - Plastoglobules :
corps protéo-lipidiques
que l'on retrouve dans
les chloroplastes.

140 jours d'expérimentation. De la même façon, les plants de *Pistacia lentiscus* exposés à l'ozone en 2002 n'ont pas développé de symptômes, alors qu'en 2000 ce polluant avait provoqué un rougissement des feuilles (REIG-ARMINANA *et al.* 2004, SANZ *et al.* 2001). En 2005, des plants de térébinthe (d'une autre provenance que ceux fumigés en 2000 et 2002) ont été à nouveau exposés à l'ozone, à des régimes plus modérés (NF+30 ppb)(données non publiées). Les symptômes clairement observés en 2000, comprenant les ponctuations et le jaunissement des feuilles ont été constatés en 2005 après 22 jours (AOT40=8129 ppb*h; moyenne sur 12h [8:00-20:00]=70.4 ppb). En dépit d'une longue période d'exposition à l'ozone et de valeurs élevées d'AOT40, les raisons d'une résistance accrue repérée sur les deux espèces en 2002 ne sont pas très bien comprises.

Il est possible que les conditions climatiques de 2002 aient modifié la réaction classique de la plante et que les caractéristiques de la feuille aient joué un rôle. En effet, en 2002, un aspect plus coriace des feuilles des deux espèces a été noté, en comparaison avec les années 2000 et 2005. Les plants des deux espèces ont grandi dans des pots, à l'intérieur de l'OTC pendant deux ans. Ils ont pu probablement subir des périodes de stress ayant pour conséquence un durcissement des feuilles, qui aurait eu tendance à augmenter la résistance au polluant.

Discussion et conclusions

La présente expérimentation sur le *Pistacia terebinthus* (arbuste à feuilles caduques) a été menée en même temps que l'exposition à l'ozone de plants de *P. lentiscus* (arbuste à feuilles persistantes). Les principaux objectifs de cette étude étaient d'une part, de caractériser les altérations anatomiques produites par l'ozone sur le térébinthe et d'autre part, de comparer les types de réponses et leurs échelonnements dans le temps avec ceux rapportés antérieurement pour le *P. lentiscus* (REIG-ARMINANA *et al.* 2004). Une hypothèse à tester fut que la différence entre feuille caduque et feuille persistante puisse influencer sur la sensibilité de la plante et son type de réponse.

Au niveau de la taille des chloroplastes et de leur dégradation ultérieure, les modifications engendrées sur les feuilles exposées à

l'ozone sont semblables à celles constatées durant le vieillissement d'une feuille (DODGE 1970, INADA *et al.* 1998) : par exemple, modifications de taille et réduction en nombre, ou accumulation de plastoglobules⁷ (GÜNTHARDT-GOERG *et al.* 2000, MIKKELSEN & HEIDE-JØRGENSEN 1996, PÄÄKKÖNEN *et al.* 1995). Bien que des études ultra-structurales n'ont pas été menées dans ce présent travail, l'observation par microscope optique montre une altération de la forme du chloroplaste similaire, ainsi que sa réduction en taille puis en nombre. Des études récentes indiquent que les plantes exposées à l'ozone subissent une production majorée d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et une induction dans l'expression des gènes de sénescence (SAG) (MILLER *et al.* 1999), déclenchant un vieillissement accéléré (ZIMMERMANN & ZENTGRAF 2005).

L'ozone a produit au départ une accumulation d'amidon dans les chloroplastes qui a plus tard disparu. WELLBURN & WELLBURN (1994) ont fumigé le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) avec de l'ozone et ont découvert qu'en été, les plantes exposées à l'ozone montraient une importante accumulation d'amidon (particulièrement dans l'endoderme), avec simultanément un écrasement des cellules du phloème. L'accumulation de l'amidon le long des nervures de la feuille a également été observée au sein des espèces d'arbustes, comme par exemple chez le *Betula* (LANDOLT *et al.* 1997). Les auteurs des deux études ont conclu qu'une telle accumulation d'amidon était probablement due à un chargement altéré du phloème, une interprétation qui pourrait être également appropriée pour expliquer nos résultats. Les données non publiées des auteurs de la présente étude montrent que l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes, considérée comme une réaction à l'ozone, se produit également dans plusieurs autres espèces, par exemple chez la plante endémique de Méditerranée *Lamottea diana* ou au sein des espèces d'*Acer*. Le phloème altéré, comme observé dans cette présente étude, contribue probablement à l'inhibition du transport du carbohydrate des feuilles aux organes « végétatifs ». De telles modifications dans le phloème (et le canal sécréteur adjacent) sont semblables à celles concernant le *P. lentiscus*, précédemment rapportées (REIG-ARMINANA *et al.* 2004).

D'autre part, des modifications, telles qu'une légère croissance de la cuticule, le développement de protusions pectineuses ou

de fibres dans les parois cellulaires, ainsi que l'accumulation de callose et de composés phénoliques (incluant les tanins) pourrait être interprétées comme étant des mécanismes de défense. L'augmentation de l'épaisseur de la cuticule est une réponse au stress (par exemple stress hydrique, salinité, U.V.) et a été observée dans le maquis méditerranéen, notamment sur l'*Arbutus unedo* (BUSSOTTI *et al.* 2003) et le *Pistacia lentiscus* (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004) après fumigation à l'ozone. Les protusions pectineuses et les fibres sont liées à l'éclatement oxydatif de l'apoplaste⁸ et ont été constatées suite à des traitements enrichis en ozone à la fois chez les espèces à feuilles caduques (par exemple GÜNTHARDT-GOERG *et al.* 1997) et persistantes (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004). La disposition en bandes, aspect non homogène des vacuoles, rapportée dans cette présente étude et semblable à ce qui avait été observé précédemment pour le *Pistacia lentiscus* (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004), suggère que des tanins ont condensé ou précipité dans certaines zones des vacuoles, comme il l'a été également constaté chez différentes espèces d'arbustes par GÜNTHARDT-GOERG *et al.* (2000).

L'accumulation de composés secondaires comme les composés phénoliques est renforcée par l'ozone (VOLLENWEIDER *et al.* 2003) et, concrètement, l'augmentation de la teneur en tanin, après exposition à l'ozone lors d'expérimentations de fumigation, a été rapportée, par exemple dans les feuilles de bouleau (PÄÄKKÖNEN *et al.* 1998). L'accumulation d'un composé phénolique est considérée comme étant une réponse active de la plante à des stress environnementaux différents : l'ozone, mais aussi d'autres polluants (PASQUALINI *et al.* 2003), de faibles réserves en nutriment ou des facteurs environnementaux comme la sécheresse (BUSSOTTI *et al.* 1995) ou UV-B (PAOLETTI 2005). La callose est présente dans le pollen, dans les zones d'abscission et les cellules conductrices du phloème, devenant un composant transitoire de la plaque cellulaire dans les cellules mitoyennes. Lors d'attaques pathogènes, elle se dépose dans les zones où la réponse devient hypersensible (VLEESHOUWERS *et al.* 2000), contribuant à isoler ces tissus des cellules saines. Blessure, dessiccation et toxicité du métal accentuent également l'accumulation de callose (STONE & CLARKE 1992). Comme dans ce présent rapport, plusieurs autres études ont mis en évidence une augmentation du dépôt de callose dans les

feuilles exposées à l'ozone (e.g., BUSSOTTI *et al.* 2003, GRAVANO *et al.* 2003, GÜNTHARDT-GOERG *et al.* 1997), soulignant que les attaques par des pathogènes et par l'ozone ont en commun certaines réactions de plantes (SCHRAUDNER *et al.* 1997, SANDERMANN 1998, LANGEBARTELS *et al.* 2002).

Il est intéressant de remarquer que, en dépit des différentes caractéristiques de feuilles (caduque et persistant), les modifications observées pour le *P. terebinthus* sont très semblables à celles précédemment rapportées pour le *P. lentiscus* (REIG-ARMIÑANA *et al.* 2004). Cependant, elles diffèrent nettement sur le timing. Chez le *P. terebinthus*, les altérations de chloroplastes, l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes et leur dégénérescence ultérieure, la dégradation des parois cellulaires, les modifications du contenu vacuolaire et la dégradation ultérieure de la vacuole, ainsi que les altérations dans les parois cellulaires sont survenues plus rapidement et à des doses plus faibles que pour le *P. lentiscus*. Par conséquent, l'hypothèse que les espèces à feuilles caduques, *P. terebinthus*, seraient plus sensibles à l'ozone que les espèces persistantes, possédant des feuilles plus petites et mieux adaptées aux conditions xériques a été confirmée par l'analyse microscopique. Une étude complémentaire menée en 2005 (sous presse) appuie également les résultats microscopiques mentionnés : tandis que les plants de *Pistacia terebinthus* ont montré rapidement des lésions visibles et un vieillissement accéléré, *P. lentiscus* était comparativement bien plus résistant. Différentes études ont montré que chez les espèces persistantes, le système antioxydant est adapté pour résister aux conditions de stress comme la sécheresse estivale (e.g. FARIA *et al.* 1996, MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS 2003), une caractéristique qui pourrait également conférer une résistance renforcée à l'ozone (NALI *et al.* 2004). La possibilité qu'une réduction de la conductance stomatale puisse contribuer à diminuer la capture d'ozone (évitement) au sein de ces espèces devrait aussi être testée.

Il y a plusieurs hypothèses possibles pour expliquer la différence d'intensité des lésions visibles au sein des plantes d'une même population : en 2000, apparition rapide des lésions visibles et en 2002, pas de lésion visible. Alors que les plantes en 2002 étaient âgées de 2 ans, les plantes fumigées en 2005, provenant d'une autre population, étaient du même âge et ont au contraire développé des

8 - L'apoplaste correspond au réseau de parois en contact les unes avec les autres

Francisco José
GARCÍA-BREJO^{ac}
José REIG-
ARMIÑANA^a
Belén BAUTISTA-
PERIS^a,
Vicent CALATAYUD^b
Julia CERVERÓ^b
Maria José SANZ^b

a- Laboratorio
de Anatomía
e Histología Vegetal
"Julio Irazo"
Jardín Botánico
Universitat de
València. c/Quart, 80.
46008 Valencia
Espagne

b- Fundación
C.E.A.M., Charles R.
Darwin
14, Parc Tecnològic,
46980 Paterna,
Valencia, Espagne

c- Departamento
de Ecosistemas
Agroforestales.
Escuela Técnica
Superior del Medio
Rural y Enología.
Universidad
Politécnica
de Valencia. Avda.
Blasco Ibáñez, 21.
46010, Valencia,
Espagne

Mél : vicent@ceam.es
Tél. : 0034- 961318227
Fax : 0034-961318190

syntômes rapidement. De ce fait, on ne peut pas conclure que les plantes plus âgées sont en général plus résistantes. Nous avons remarqué que les feuilles étaient plus coriaces en 2002, résultant probablement d'un effet de stress hydrique survenu occasionnellement en période hivernale, lorsque l'arrosage était réduit, et/ou les températures étaient élevées, de 2000 à 2002.

Les plantes méditerranéennes cultivées dans des pépinières sont régulièrement soumises à un durcissement avant plantation, en réduisant l'arrosage ; cela augmente la résistance au stress et spécialement à la sécheresse (VILAGROSA *et al.* 2003). On suppose que ces plantes auraient subi un tel traitement, conduisant au développement de feuilles plus coriaces, qui seraient plus résistantes à l'ozone. Cette hypothèse devrait tout de même être testée lors d'une expérimentation ad hoc. Dans tous les cas, ces résultats indiquent une grande variabilité dans la réaction du *P. terebinthus* et souligne la complexité des interactions plante-ozone, qui comprend non seulement les aspects comme la capacité à éviter l'absorption d'ozone, mais aussi la capacité de désintoxication des cellules ou les mécanismes de défense des espèces et de chaque plante.

Remerciements

M.J.S. et V.C. remercient le DGB (MMA) et la Conselleria de Territorio y Vivienda (projet FORMEDOZON, Interreg III B) pour avoir financé cette étude, la Generalitat Valenciana et Bancaja pour leur soutien à la Fundación CEAM. Nous sommes également reconnaissants à l'égard de Carmen Martín pour son aide dans la collecte périodique des échantillons et pour le soin apporté aux plantes et à l'égard d'Esperanza Calvo pour l'aide apportée sur les calculs de l'AOT40. Nous remercions également Florence Maixent pour la traduction et Laurence Dalstein pour la révision du manuscrit.

Références

- Barnes J.D., Gimeno B.S., Davison A.V., Bussotti F., Velisariou D. & Gerant D. 1999. Air pollution impacts on Mediterranean pine forest. - In: Nee'man G., & Trabaud L. (Eds.), *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and Pinus brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*, p. 1-14. - Backhuys, Leiden.
- Bussotti F., Bottacci A., Bartolesi A., Grossoni P. & Tani C. 1995. Morpho-anatomical alterations in leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in conditions of natural water stress. - *Environmental and Experimental Botany* 35: 201-213.
- Bussotti F., Gravano E., Grossoni P., Tani C. & Mori B. 2003. Ultrastructural responses of a Mediterranean evergreen shrub (*Arbutus unedo* L.) fumigated with ozone. - In: Karnosky D.F., Percy K.E., Chappelka A.H., Simpson C.J. & Pikkariainen J. (Eds.), *Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium. Developments in Environmental Science*, 3 (Ser. Ed. Krupa, S.V.), p. 269-276. - Elsevier Science Ltd., Oxford, UK.
- Chappelka A.H. & Chevone B.I. 1992. Tree responses to ozone. - In: Lefohn, A.S. (Ed.), *Surface-level Ozone Exposures and Their Effects on Vegetation*, p. 271-324. - Lewis Publish. Inc., Chelsea, MI.
- Dalstein L. & Vas N. 2005. Ozone concentrations and ozone-induced symptoms on coastal and alpine Mediterranean pines in southern France. - *Water Air and Soil Pollution* 160 (1-4): 181-195.
- Dodge J.D. 1970. Changes in the chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. - *Annals of Botany* 34: 817-824.
- Elvira S., Bermejo V., Manrique E. & Gimeno B.S. 2003. Differential response of two *Quercus coccifera* populations to their long-term ozone exposure. - In: Karlsson, P.E., Selldén, G., Pleijel, H. (Eds.), *Establishing Ozone Critical Levels II, UNECE Workshop Report. IVL report B 1523*, p.363-368. -IVL Swedish Environmental Research Institute, Gothenburg, Sweden.
- Faria T., García-Plazaola J.I., Abadía A., Cerasoli S., Pereira J.S. & Chaves M.M., 1996. Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. - *Tree Physiology*, 16:115-123.
- Fiala J., Cernikovský L., de Leeuw F. & Kurfuerst, P. 2003. Air pollution by ozone in Europe in summer 2003. Overview of exceedances of EC ozone threshold values during the summer season April-August 2003 and comparison with previous years. - Copenhagen, European Environmental Agency (EEA Topic Report 3/2003).
- Fuhrer J., Skarby L. & Ashmore M.R. 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. - *Environmental Pollution* 97(1-2): 91-106.
- Gravano E., Giulietti V., Desotgiu R., Bussotti F., Grossoni P., Gerosa G. & Tani C. 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. - *Environmental Pollution* 121: 137-146.
- Gunthardt-Goerg M.S., Mcquattie C.J., Scheidegger C., Rhiner C. & Matyssek R. 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. -

- Canadian Journal of Forest Research-Journal Canadien de la Recherche Forestière 27: 453–463.
- Gunthardt-Goerg M.S., McQuattie C.J., Maurer S. & Frey B. 2000. Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. - *Environmental Pollution* 109: 489–500.
- Houghton J.T., Meira-Filho L.G., Callander B.A., Harris N., Kattenberg A. & Maskell K. 1996. *Climate Change 1995, The Science of Climate Change*. - Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H. & Kuroiwa T. 1998. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. - *Planta* 205: 153–164.
- Inclán R., Ribas A., Peñuelas J. & Gimeno B. 1999. The relative sensitivity of different Mediterranean plant species to ozone exposure. - *Water Air and Soil Pollution* 116 (1–2): 273–277.
- Innes J.L., Skelly J.M. & Schaub M. 2001. Ozone and broadleaved species. A guide to the identification of ozone-induced foliar injury. [Ozon, Laubholz- und Krautpflanzen. Ein Führer zum Bestimmen von Ozonsymptomen]. - Haupt, Bern, Stuttgart, Wien.
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw Hill, New York.
- Landolt W., Gunthardt-Goerg M.S., Pfenninger I., Einig W., Hampf R., Maurer S. & Matyssek, R. 1997. Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. - *New Phytologist* 137: 389–397.
- Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grün S. & Sandermann H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. - *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 567–575.
- Manes F., Vitale M., Donato E. & Paoletti E. 1998. O₃ and O₃+CO₂ effects on a Mediterranean evergreen broadleaf tree, holm oak (*Quercus ilex* L.). - *Chemosphere*, 36 (4–5): 801–806.
- Mikkelsen T.N. & Heide-Jørgensen H.S. 1996. Acceleration of leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. by low levels of tropospheric ozone demonstrated by leaf colour, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure. - *Trees* 10: 145–156.
- Millán M.M., Salvador R., Mantilla E. & Kallos G. 1997. Photo-oxidant Dynamics in the Mediterranean Basin in Summer: Results from European Research Projects. - *Journal of Geophysical Research* 102 no.D7: 8811–8823.
- Millán M.M., Mantilla E., Salvador R., Carratalá A., Sanz M.J., Alonso L., Gangoiti G. & Navazo M. 2000. Ozone cycles in the Western Mediterranean Basin: Interpretation of monitoring data in complex coastal terrain. - *Journal of Applied Meteorology* 39: 487–508.
- Miller J.D., Arteca R.N. & Pell E.J. 1999. Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. - *Plant Physiology* 120: 1015–1023.
- Munné-Bosch S. & Peñuelas J. 2003. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. - *Annals of Botany* 92: 385–391.
- Nali C., Paoletti E., Marabottini R., Della Rocca G., Lorenzini G., Paolacci A.R., Ciaffi M. & Badiani M. 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. - *Atmospheric Environment* 38: 2247–2257.
- Pääkkönen E., Holopainen T. & Karenlampi L. 1995. Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in leaves of birch (*Betula pendula* Roth) clones as affected by low ozone exposure. - *Annals of Botany* 75: 285–294.
- Pääkkönen E., Günthardt-Goerg M.S. & Holopainen J.K. 1998. Responses of leaf processes in a sensitive birch (*Betula pendula*) clone to ozone combined with drought. - *Annals of Botany* 82: 49–59.
- Paoletti E., Nali C., Marabottini R., Della Rocca G., Lorenzini G., Paolacci A.R., Ciaffi M. & Badiani M. 2003. Strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen species. In: Karlsson, P.E., Selldén, G., Pleijel, H. (Eds.), *Establishing Ozone Critical Levels II, UNECE Workshop Report. IVL report B 1523*, p. 336–350. IVL Swedish Environmental Research Institute, Gothenburg, Sweden.
- Paoletti E. 2005. UV-B and Mediterranean forest species: Direct effects and ecological consequences. - *Environmental Pollution* 137: 372–379.
- Pasqualini, V.; Robles, C.; Garzino, S.; Greff, S.; Bousquet-Melou, A.; Bonin, G. 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. - *Chemosphere* 52:239–248.
- Reig-Armiñana J., Calatayud V., Cerveró J., García-Breijo F.J., Ibáñez A. & Sanz M.J. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). - *Environmental Pollution* 132: 321–331.
- Ribas A., Peñuelas J., Elvira S. & Gimeno B.S., 2005. Contrasting effects of ozone under different water supplies in two Mediterranean tree species. - *Atmospheric Environment* 39: 685–693.
- Sandermann H., Ernst D., Heller W. & Langebartels C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions [Review]. - *Trends in Plant Science* 3: 47–50.
- Sanz M.J. & Millán M.M. 1998. The dynamics of aged air masses and ozone in the western Mediterranean: relevance to forest ecosystems. - *Chemosphere* 38: 1089–1094.
- Sanz M.J., Calatayud V. & Calvo E. 2000. Spatial pattern of ozone injury in Aleppo pine related to air pollution dynamics in a coastal-mountain region of eastern Spain. - *Environmental Pollution* 108: 239–247.
- Sanz M.J., Sánchez G., Calatayud V., Minaya M.T. & Cerveró J. 2001. La contaminación atmosférica en los bosques. Guía para la identificación de daños visibles causados por ozono, p 1–163 p. - Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España.
- Sanz, M.J., Calatayud, V., Sanchez, G. 2007. Measures of ozone concentrations using passive sampling in forests of South Western Europe. *Environmental Pollution* 145: 620–628.
- Schraudner M., Langebartels C. & Sandermann H. 1997. Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. - *Physiologia Plantarum* 100: 274–280.
- Stone B.A. & Clarke A.E. 1992. *Chemistry and biology of (1 → 3) β-D-glucans*. La Trobe University Press, Melbourne.

- Vilagrosa A., Cortina J., Gil-Pelegrín E. & Bellot J. 2003. Suitability of drought-preconditioning techniques in Mediterranean climate. - *Restoration Ecology* 11(2): 208–216.
- Vleeshouwers V.G.A.A., van Doijeweert W., Govers F., Kamoun, S. & Colon L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. - *Planta* 210: 853–864.
- Vollenweider P., Ottiger M., Günthardt-Goerg M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. - *Environmental Pollution* 124: 101–118.
- Wellburn F.A.M & Wellburn A. 1994. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness in *Pinus halepensis* (Mill.). - *Journal of Experimental Botany* 45, 607–614.
- Zimmermann P. & Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. - *Cellular and Molecular Biology Letters* 10: 515–534.

Résumé

Les changements anatomiques produits sur les feuilles de *Pistacia terebinthus* (térébinthe), arbuste à feuilles caduques, ont été étudiés au moyen d'une expérience en chambres à ciel ouvert (OTC). Les plantes ont été soumises à trois différents niveaux d'ozone entre mai et octobre 2002 : Air Filtré au Charbon actif [contrôle] (moyenne sur 12h = 12 ppb), Air Non Filtré + 40 ppb (moyenne sur 12h = 55 ppb) et Air Non Filtré + 80 ppb d'ozone (moyenne sur 12h = 74 ppb). Les échantillons de feuille ont été collectés périodiquement depuis le début de l'exposition. L'ozone a participé aux altérations relatives à la sénescence telles que la dégradation du chloroplaste, ainsi qu'aux réactions de type défensives comme l'accroissement de l'épaisseur cuticulaire et le dépôt de callose dans les parois cellulaires. Les feuilles des plantes exposées à l'ozone présentaient une accumulation non homogène de tanins dans les vacuoles. Pendant les premières semaines, une forte accumulation d'amidon a été repérée dans les chloroplastes. L'amidon a ensuite disparu après de longues périodes d'exposition. Les altérations anatomiques du *P. terebinthus* (à feuilles caduques) coïncident avec celles de l'étude menée précédemment sur le *Pistacia lentiscus* (arbuste à feuilles persistantes) bien qu'apparaissant plus rapidement. Ce dernier type de feuilles pourrait révéler davantage de résistance à l'ozone. Pour les deux espèces, il semble qu'il y ait une grande variabilité au sein des peuplements et en fonction du stade de développement. Ainsi, des expositions à l'ozone effectuées sur différentes années ont produit des lésions visibles, pour des doses d'ozone très différentes.

Mots clés : Ozone, lésion visible, anatomie foliaire, sénescence, méditerranéen, *Pistacia*.

Summary

Anatomical effects of ozone on the turpentine bush (*Pistacia terebinthus*)

The anatomical changes induced by ozone in leaves of the Mediterranean deciduous shrub *Pistacia terebinthus* (terebinth) were investigated in an OTC experiment. Plants were exposed to three different O₃ levels from May to October 2002: Charcoal Filtered Air [control] (12h mean= 12 ppb), Non Filtered Air + 40 ppb (12h mean= 55 ppb) and Non Filtered Air + 80 ppb ozone (12h mean= 74 ppb). Leaf samples were collected periodically from the beginning of the exposure. Ozone increased senescence-related alterations such as chloroplast degradation, as well as defense responses such as an increase in cuticular thickness and callose deposits in the cell walls.

Leaves of ozone-exposed plants showed an uneven accumulation of tannins in the vacuoles and, during the first weeks, we also observed a higher accumulation of starch in the chloroplasts, later disappearing with longer exposure periods.

The anatomical changes in *P. terebinthus* (deciduous) reduplicate those previously reported for *Pistacia lentiscus* (evergreen shrub) but take place more rapidly, suggesting that the latter type of leaf might confer added resistance to ozone.

In both species, there seems to be a large variability among populations and even of the developing stage, given that repeated ozone exposures in different years produced visible damage at very different ozone doses.