



HAL
open science

Diffusion du CO₂ dans le mésophylle des plantes à métabolisme C₃

Clément Piel

► **To cite this version:**

Clément Piel. Diffusion du CO₂ dans le mésophylle des plantes à métabolisme C₃. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2002. Français. NNT: . tel-00007597

HAL Id: tel-00007597

<https://theses.hal.science/tel-00007597>

Submitted on 1 Dec 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° D'ORDRE □7029

UNIVERSITE DE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Thèse présentée pour obtenir le
GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Par **Clément PIEL**

**Diffusion du CO₂ dans le mésophylle
des plantes à métabolisme C3**

Soutenue le 15 Novembre 2002, devant la commission d'examen □

M. **Erwin DREYER**, DR INRA, INRA de Nancy, Rapporteur

M. **Daniel EPRON**, Professeur, Université de Besançon, Examineur

M. **Bernard GENTY**, CR CNRS, CEA-Cadarache, Directeur de thèse, Examineur

M. **Francesco LORETO**, Chercheur, CNR (Italie), Rapporteur

M. **Bernard SAUGIER**, Professeur, Université Paris XI, Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de ma thèse, et parmi celles-ci ☐

-Erwin Dreyer et Francesco Loreto, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

-Bernard Saugier, pour m'avoir offert l'opportunité d'entrer au DEA d'Ecologie, accepté dans son laboratoire, participé à mes comités de thèse, puis accepté d'être examinateur de cette thèse.

-Bernard Genty, pour m'avoir proposé ce sujet, accepté la responsabilité cette thèse, et pour son encadrement.

A l'Université Paris XI

Je tiens à remercier en premier lieu Sylvie Meyer. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour son aide tout le long de mon séjour à Orsay. Un grand merci également à Jaleh Gashghaie, Valérie Le Dantec, Claire Damesin, Rodolphe Liozon, Karen Adji, Anne-Laure Cailly, Muriel Duranceau, Jacqueline Liebert, et Hendrik Davi. Merci à Marie-Claire Pelé pour son aide administrative, sans oublier Lionel et Gégé, pour avoir maintes fois sauvé mes peupliers d'une mort certaine...

Au CEA-Cadarache

Merci à Gilles Peltier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, Laurent Cournac, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, Laurent Nussaume pour son aide avec la microscopie optique, et le personnel du GRAP pour leur assistance dans la culture de mes arbres. Je tiens également à remercier chaleureusement Bernard Dimon et Patrick Carrier.

A l'INRA de Nancy

Merci à tout le personnel de l'équipe Bioclimatologie pour m'avoir accueilli après mon départ du CEA, pour leur gentillesse, et pour m'avoir fourni un environnement de travail particulièrement agréable. Je tiens à remercier tout particulièrement Erwin Dreyer pour ses encouragements. Merci également à Jean-Marc Guehl, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Je tiens à remercier chaleureusement les "charmantes et adorables"

(selon la formule consacrée...) Fabienne Froux (enfin... Tatin maintenant) et Natacha Guérard, qui ont rendu l'atmosphère de notre bureau particulièrement agréable, ainsi que Séraphine Vizoso. J'ai également beaucoup apprécié l'aide de Patrick et Rosine Gross.

Enfin, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec Ela Frak et Xavier Le Roux, et je les remercie, ainsi que le personnel de l'INRA de Clermont-Ferrand pour leur accueil et leur aide. Mon séjour à Clermont aura été particulièrement enrichissant.

AVANT PROPOS

Le travail expérimental de cette thèse a été réalisé sous la responsabilité de Bernard Genty dans deux unités de recherche :

-Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, UPRESA 8079 Université Paris XI / CNRS, bât. 362, Université d'Orsay, 91405 Orsay (du 1^{er} Octobre 1998 au 1^{er} Octobre 2000).

-Laboratoire d'Ecophysiologie de la Photosynthèse, UMR 163 CEA / CNRS, Département d'Ecophysiologie Végétale et de Microbiologie, CEA-Cararache, 13108 St Paul lez Durance (d'Octobre 2000 au 15 Octobre 2001).

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Photosynthèse et diffusion du CO₂ dans les tissus foliaires des végétaux supérieurs en C3	
I.1 Fonctionnement photosynthétique foliaire	4
I.1.1 Réactions biochimiques de fixation du CO ₂	
I.1.2 Dégagement de CO ₂ non photorespiratoire	5
I.2 Structure des feuilles et transfert des gaz	
I.2.1 Organisation foliaire	
I.2.2 Diffusion des gaz dans le mésophylle au cours de la photosynthèse	10
I.3 Quantification des limitations à la diffusion	14
I.3.1 Expression d'une limitation sous la forme d'une conductance	
I.3.2 Conductances à la diffusion du CO ₂ et à la vapeur d'eau	15
I.4 Couplage d'un modèle du métabolisme photosynthétique avec un modèle de diffusion du CO ₂	17
I.4.1 Modèle de Chartier <i>et al.</i>	
I.4.2 Modèle de Farquhar <i>et al.</i>	18
CHAPITRE II : Estimation de la conductance interne	
II.1 Principales méthodes d'estimation de la conductance interne	28
II.1.1 Introduction	
II.1.2 Diffusion à travers la couche limite et les stomates	
II.1.3 Discrimination isotopique du ¹³ CO ₂	32
II.1.4 Couplage des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne	34
II.1.5 Marquage à l' ¹⁸ O	41
II.1.6 : Conclusion	
II.2 Paramétrisation et mesures associées à l'estimation de g ⁱ	42
II.2.1 Introduction	
II.2.2 Courbes de réponse de A _n au CO ₂ sous plusieurs éclairagements	43
II.2.3 Relation entre le point de compensation pour le CO ₂ et la concentration en oxygène	46
II.2.4 Conclusion	49
II.3 Protocoles et paramétrisation	
II.3.1 Protocoles pour estimer la conductance interne	
II.3.2 Protocoles pour estimer la spécificité de la Rubisco et la respiration à la lumière	50
II.4 Variabilité de la spécificité de la Rubisco et de la respiration à la lumière	51
II.4.1 Introduction	
II.4.2 Matériel et méthodes	52
II.4.3 Résultats	
II.4.4 Discussion	53
II.4.5 Conclusion	56

CHAPITRE III : Origines de la limitation interne

III.1	Introduction	57
III.2	Matériel et méthodes	59
	III.2.1 Matériel végétal	
	III.2.2 Echanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne	60
	III.2.3 Microscopie et mesures anatomiques	65
III.3	Résultats	67
	III.3.1 Anatomie foliaire	
	III.3.2 Relation entre \square_{PSII} et \square_e	69
	III.3.3 Fonctionnement stomatique du peuplier hybride "peace" et rapport des diffusivités de la vapeur d'eau entre hélox et air, et entre hélium et azote	
	III.3.4 Conductances au CO ₂	70
III.4	Discussion	71
	III.4.1 Comportement stomatique sous une atmosphère à base d'hélium	
	III.4.2 Diffusivités théoriques et <i>in vivo</i>	72
	III.4.3 Validité du couplage échanges gazeux / fluorescence dans l'air et l'hélox	73
	III.4.4 Conductance dans les espaces gazeux intercellulaires	
	III.4.5 Origine de la conductance en phase liquide	75
III.5	Conclusion	78

CHAPITRE IV : Variabilité de la conductance interne

IV.1	Introduction	79
IV.2	Variabilité interspécifique	
	IV.2.1 Introduction	
	IV.2.2 Matériel et méthodes	80
	IV.2.3 Résultats et discussion	81
	IV.2.4 Conclusion	83
IV.3	Variabilité phénotypique de la conductance interne chez le noyer en réponse à l'éclairement et à un enrichissement en CO ₂	84
	IV.3.1 Introduction	
	IV.3.2 Matériel et méthodes	86
	IV.3.3 Résultats	89
	IV.3.4 Discussion	91
	IV.3.5 Conclusion	94
IV.4	Conclusion	95

CONCLUSION GENERALE 97

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 101

ANNEXES

Annexe I	Dispositifs couplant échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne	112
Annexe II	Correction du signal de l'analyseur Licor 6262 en vue de son utilisation avec des mélanges gazeux à base d'hélium	119
Annexe III	Modification d'une chambre d'échange gazeux pour minimiser la diffusion du CO ₂	125
Annexe IV	Détermination de la température foliaire dans la chambre d'échanges gazeux par thermométrie infrarouge	127
Annexe V	Estimation de la conductance de couche limite par la méthode du bilan d'énergie foliaire	131

LISTE DES ABREVIATIONS

A_n, A_n^{\max}	Assimilation nette de CO_2 respectivement à un moment donné, et maximale (estimée à éclairement saturant).
C_a, C_{es}, C_c	Fraction molaire de CO_2 respectivement dans l'air ambiant, dans les espaces évaporants foliaires, et aux sites de carboxylation de la Rubisco.
D_{yx}	Diffusivité du gaz x dans le mélange gazeux y. x étant remplacé par c pour le CO_2 , w pour la vapeur d'eau, et y par a pour l'air, n pour l'azote, h pour l'hélium et hx pour l'hélox.
E	Transpiration foliaire.
f_{ias}, f_{ias}^{mes}	Fraction du volume foliaire occupé par les espaces gazeux, et fraction du volume du mésophylle occupé par les espaces gazeux.
g_w^b, g_c^b	Conductance de couche limite respectivement à la vapeur d'eau et au CO_2
g^i, g^{ias}, g^{liq}	Conductance au CO_2 respectivement interne, dans les espaces gazeux intercellulaires du mésophylle, et dans la phase liquide cellulaire du mésophylle.
g_w^s, g_c^s	Conductance stomatique respectivement à la vapeur d'eau et au CO_2 .
g_w^t, g_c^t	Conductance totale foliaire respectivement à la vapeur d'eau et au CO_2 .
\square, \square^*	Point de compensation pour le CO_2 respectivement en présence et en l'absence de respiration mitochondriale.
I	Eclairement incident.
J, J^{\max}	Flux d'électron photosynthétique (exprimé en $\mu\text{mol electrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) respectivement à un moment donné et maximal.
K_c, K_o	Constante cinétique de la Rubisco, respectivement pour le CO_2 et l' O_2 .
L	Épaisseur foliaire.
LMA	Masse surfacique.
\square	Trajet moyen de diffusion du CO_2 dans le réseau d'espaces gazeux intercellulaire du mésophylle (estimé par modélisation).
O	Fraction molaire d'oxygène.
R_d, R_{obs}	Respiration foliaire respectivement à la lumière et à l'obscurité.
Rubisco	Ribulose 1,5 bisphosphate oxygenase/ carboxylase
S	Facteur de spécificité de la Rubisco

- V_c, V_c^{\max} Vitesse de carboxylation par la Rubisco, respectivement à un moment donné et maximale.
- V_o, V_o^{\max} Vitesse d'oxygénation par la Rubisco, respectivement à un moment donné et maximale.
- w_a, w_{es} Fraction molaire de vapeur d'eau, respectivement dans l'air ambiant et dans les espaces évaporant foliaires.

PUBLICATIONS REALISEES EN
RELATION AVEC CE TRAVAIL

Revue à comité de lecture :

Le Roux X., Bariac T., Sinoquet H., Genty B., Piel C., Mariotti A., Richard P. (2001). Spatial distribution of leaf water use efficiency and carbon isotope discrimination within an isolated tree crown : field observation and model simulation. *Plant Cell and Environment* **10** : 1021-1033.

Piel C., Frak E., Le Roux X., Genty B. (2002). Effect of local irradiance on CO₂ transfer conductance of mesophyll in walnut. *Journal of Experimental Botany* (in press).

Chapitres d'ouvrages :

Genty B., Meyer S., Piel C., Badeck F.W., Liozon R. (1998). CO₂ diffusion inside leaf mesophyll of ligneous plants. In Garab G. (ed). *Photosynthesis : Mechanism and Effects*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 3961-3966.

INTRODUCTION

La compréhension des facteurs déterminant l'assimilation du CO₂ atmosphérique à l'échelle de la feuille est nécessaire à de nombreuses études écophysiologicals consacrées aux flux de carbone entre les couverts végétaux et l'atmosphère, et plus généralement au cycle du carbone dans les écosystèmes. La feuille est en effet la principale interface entre la plante et l'atmosphère, et le lieu de la quasi-totalité des entrées de carbone d'une plante. Beaucoup de travaux consacrés à la prédiction de la manière la plus fiable possible de cette assimilation grâce à des modèles mathématiques à des échelles variées (feuille, couvert, écosystème) nécessitent également une connaissance approfondie de la physiologie photosynthétique foliaire.

Pour appréhender l'assimilation du CO₂ par la feuille, les physiologistes ont proposé de dissocier deux types de facteurs : (i) d'une part, des facteurs biophysiques et biochimiques, liés au fonctionnement de la machinerie photosynthétique foliaire (conversion de la lumière en énergie chimique, puis utilisation de cette énergie pour fixer le CO₂ sous la forme de molécules organiques), (ii) et d'autre part des facteurs diffusifs, déterminant la disponibilité en CO₂ au niveau de la machinerie photosynthétique.

L'échelle abordée au cours de cette thèse est celle de la feuille, chez les végétaux ayant un métabolisme photosynthétique de type C₃, et nous nous concentrerons sur ces facteurs diffusifs. Ces facteurs sont définis et quantifiés sous la forme de limitations (de résistances) au transfert des gaz, à l'origine d'un gradient de concentration du CO₂ entre l'atmosphère et la machinerie photosynthétique dans les cellules assimilatrices. La mieux connue de ces limitations est la diffusion par les stomates (pores ayant une ouverture variable, permettant la diffusion gazeuse entre l'atmosphère et le tissu photosynthétiquement actif de la feuille). Cet aspect très étudié de la diffusion du CO₂ est la plupart du temps considéré comme le principal facteur influençant la disponibilité du CO₂ au niveau de la machinerie photosynthétique. Un autre aspect de la diffusion du CO₂ a été fréquemment négligé : la limitation de la diffusion du CO₂ à l'intérieur de la feuille (limitation interne), tout d'abord dans les espaces gazeux du tissu foliaire (le mésophylle), puis à l'intérieur des cellules assimilatrices. Cette thèse sera consacrée à l'étude de la diffusion interne du CO₂.

Les premières techniques fiables permettant d'estimer la limitation interne ne sont disponibles que depuis le milieu des années 80. Ces premiers travaux ont mis en évidence le fait que contrairement à la limitation opposée par les stomates, celle opposée par le mésophylle est de nature constitutive, constante et non régulée pendant la journée. L'essentiel des travaux se sont ensuite consacrés à (i) caractériser la variabilité de cette limitation, et (ii) à déterminer son origine. La variabilité interspécifique de la limitation interne est de mieux en

mieux connue. On sait ainsi que l'importance de la limitation interne est corrélée avec celle de la limitation par les stomates, et qu'elle est d'autant plus faible que l'assimilation nette maximale de CO₂ est élevée. D'autre part, les espèces ligneuses semblent se distinguer des espèces herbacées par une plus forte limitation interne. Par contre, très peu d'études se sont penchées sur la variabilité intraspécifique de la limitation interne.

La théorie prévoit que la limitation interne est la résultante d'un transfert en phase gazeuse (diffusion du CO₂ dans le réseau d'espaces gazeux foliaires, lesquels peuvent représenter jusqu'à la moitié du volume du mésophylle) et un transfert en phase liquide (diffusion en solution sur une courte distance dans les cellules assimilatrices). Jusqu'ici, l'essentiel des travaux ont abordé ce problème par modélisation mathématique, et peu de travaux expérimentaux n'ont permis de quantifier directement les contributions relatives de ces deux composantes.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de travailler sur quelques ligneux, qui présentent *a priori* une importante limitation interne. Notre travail a été consacré à (i) un approfondissement méthodologique sur l'estimation de la limitation interne, ensuite (ii) à une approche expérimentale originale permettant de quantifier les contributions des transferts en phase gazeuse et en phase liquide à la limitation interne, et enfin (iii) à la variabilité de la limitation interne, et tout particulièrement plusieurs aspects de sa variabilité phénotypique (réponse à l'acclimatation à l'ombre ou à la lumière et à un enrichissement en CO₂, ainsi que sa variabilité dans la couronne d'un arbre).

*Mon mémoire sera dissocié en quatre parties. Dans un **premier chapitre**, les principaux concepts utilisés pendant cette thèse seront décrits. Le **deuxième chapitre** sera consacré à la présentation de la méthode mise en œuvre pour étudier la limitation interne, et des améliorations qui ont été apportées. Les chapitres suivants présenteront les résultats obtenus pendant cette thèse : (i) dans le **troisième chapitre**, les composantes en phase gazeuse et en phase liquide cellulaire de la limitation interne seront quantifiées, (ii) puis dans le **quatrième chapitre**, la variabilité génotypique et phénotypique de la limitation interne sera caractérisée.*

CHAPITRE I

Photosynthèse et diffusion du CO₂ dans les
tissus foliaires des végétaux supérieurs en C3

I.1 : Fonctionnement photosynthétique foliaire

La feuille est un organe spécialisé des végétaux supérieurs, présentant une grande diversité morphologique. Elle est le lieu de la quasi-totalité des entrées de carbone de la plante et constitue la principale interface entre la plante et l'atmosphère. La photosynthèse foliaire permet de synthétiser des molécules glucidiques en fixant le CO₂ atmosphérique, et en utilisant comme énergie le rayonnement solaire.

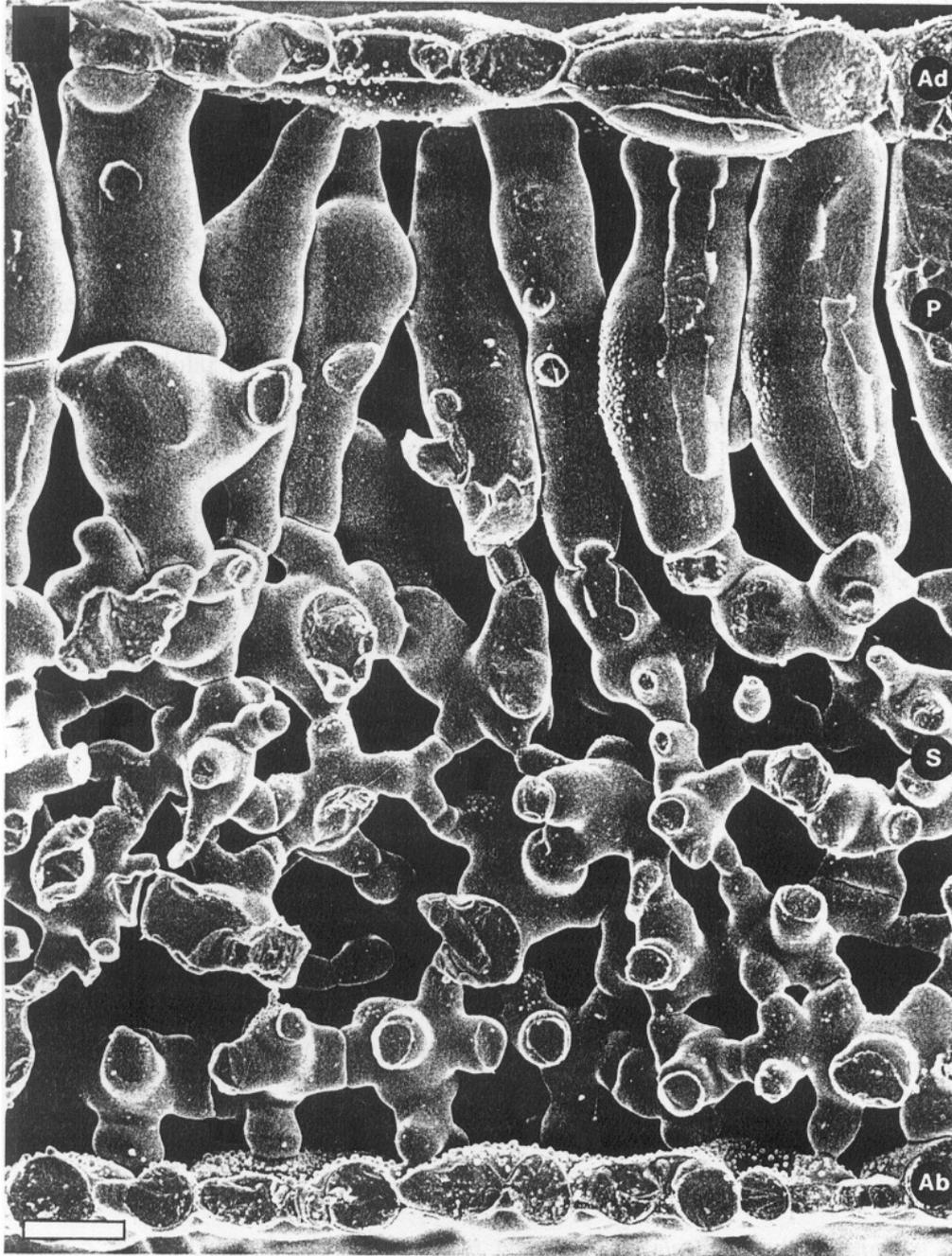
I.1.1 : Réactions biochimiques de fixation du CO₂

L'énergie nécessaire à la fixation photosynthétique du CO₂ est fournie par des réactions dites "photochimiques" intervenant dans le chloroplaste. Une fraction de la lumière utile pour la photosynthèse est interceptée par les membranes thylakoïdiennes grâce à des complexes pigmentaires, puis est convertie en énergie chimique (ATP et NADPH) grâce à une chaîne de transporteurs d'électrons (non décrite ici).

L'incorporation du CO₂ dans une molécule de Ribulose 1,5 bisphosphate (RubP) est catalysée par une enzyme chloroplastique : la Rubisco (Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase / oxygénase). Cette réaction s'insère dans un cycle biochimique (cycle de Calvin) visant à régénérer le RubP, intervenant dans le stroma chloroplastique, et utilisant l'ATP et le NADPH produit par les réactions photochimiques. Le carbone incorporé ne servant pas à la régénération du RubP permet la synthèse d'une molécule organique à trois carbones : le glycéraldéhyde-3-phosphate, lequel pourra être exporté du cycle et servir à la synthèse d'amidon.

La Rubisco possède également une activité oxygénase, compétitrice de l'activité carboxylase, qui permet l'oxydation du RubP par l'oxygène. Ce processus appelé photorespiration est à l'origine d'un nouveau cycle biochimique, se répartissant dans trois compartiments cellulaires : chloroplastes, peroxyosomes et mitochondries. La partition entre carboxylation et oxygénation du RubP est fonction des concentrations de CO₂ et d'O₂ au niveau des sites actifs de la Rubisco. Si l'on diminue la concentration en O₂, l'activité du cycle photorespiratoire décroît. Inversement, une plus faible disponibilité du CO₂ augmente l'activité du cycle photorespiratoire. La répartition entre carboxylation et oxygénation est également affectée par la température : lors d'une élévation de la température foliaire, la solubilité de l'O₂ décroît moins vite que celle du CO₂ ce qui favorise la photorespiration. Pour

Figure 1.1 : Coupe par cryofracture d'une feuille de *Phaseolus vulgaris* observée par microscopie électronique à balayage. Légende : Ad = épiderme adaxial, Ab = épiderme abaxial, P = parenchyme palissadique, S = parenchyme lacuneux. La barre représente 20 μm . Tiré de Jeffrey *et al.*, 1987.



une mole d'oxygène utilisée par la Rubisco, le cycle produit une demi mole de carbone (libération d'une demi mole de CO_2) et il a été estimé que 20 à 30% du carbone fixé est consommé par la photorespiration (Lawlor, 1993).

I.1.2 : Dégagement de CO_2 non photorespiratoire

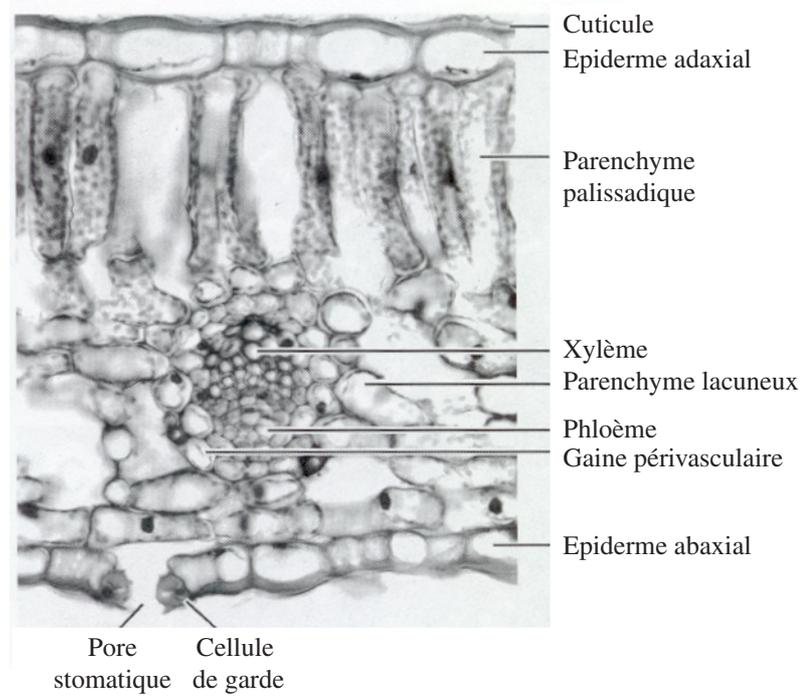
La respiration liée au cycle de Krebs intervient dans les mitochondries, et permet la fourniture d'énergie à la cellule sous la forme de composés réducteurs et d'ATP, grâce à l'oxydation de composés carbonés dans un cycle biochimique (cycle de Krebs). A l'obscurité, la respiration foliaire (R_{obs}) résulte du dégagement de CO_2 lié à l'activité du cycle de Krebs. A la lumière, la respiration foliaire est la résultante du dégagement de CO_2 photorespiratoire ainsi que de la respiration liée au cycle de Krebs (notée R_d). De nombreuses études ont mis en évidence que R_d est plus faible que R_{obs} (Atkin, *et al.*, 2000, Atkin, *et al.*, 1998, Brooks et Farquhar, 1985, Laisk, 1977). Le degré d'inhibition de R_{obs} par la lumière est très variable (entre 16 et 77%, Atkin, *et al.*, 2000) selon les espèces, l'éclairement et la température foliaire. Les rôles physiologiques de cette persistance de l'activité du cycle de Krebs à la lumière sont potentiellement nombreux, comme le maintien de voies métaboliques nécessitant des composés issus de la mitochondrie (par exemple l'acétyl-coA et l'acétate pour les synthèses lipidiques), la fourniture d'ATP pour la synthèse de saccharose (Krömer, 1995), et une participation à la protection contre la photoinhibition (oxydation de composés réducteurs en excès, Saradadevi et Raguavendra, 1992).

I.2 : Structure des feuilles et transfert des gaz

I.2.1 : Organisation foliaire

Les feuilles sont des organes spécialisés présentant une très grande diversité morphologique. Elles sont classiquement composée d'un pétiole, d'un limbe, et d'un système vasculaire. Leur structure reflète deux types de contraintes. D'une part, le limbe contient le tissus photosynthétiquement actif (mésophylle), et la structure foliaire doit intercepter efficacement la lumière et faciliter la diffusion du CO_2 entre l'atmosphère et les cellules assimilatrices. D'autre part, la feuille est la principale surface transpirante de la plante, et l'eau étant une ressource fréquemment limitante, elle doit être en mesure de limiter et réguler la

Figure 1.2 : Coupe transversale d'une feuille d'*Helleborus niger* observée en microscopie optique.
Tiré de Dickison, 2000. Echelle approximative : 1cm pour 20 μ m.



perte d'eau par transpiration. Deux photographies de la structure typique d'une feuille d'un ligneux est présenté dans les figures 1.1 et 1.2.

1.2.1.1 : Surface foliaire

Dans la plupart des cas, les feuilles ont une structure bifaciale : la surface abaxiale (inférieure) et la surface adaxiale (supérieure). Les gymnospermes ont souvent une structure particulière, comme les aiguilles chez beaucoup de conifères.

La surface foliaire est recouverte d'un épiderme. Les cellules épidermiques sont des cellules non chlorophylliennes organisées en assises compactes (sans espaces gazeux intercellulaires) à l'interface limbe / atmosphère. Le nombre d'assises est variable, et peut différer entre les deux faces d'une même feuille. L'épaisseur de l'assise épidermique est également très variable, et est fréquemment moins élevée sur la face abaxiale. Ces assises offrent un support mécanique ainsi qu'une protection des assises cellulaires assimilatrices situées plus profondément dans le mésophylle. Les cellules épidermiques sont recouvertes par une couche hydrophobe de nature lipidique (composée de cutine et de cires) : la cuticule. L'épaisseur et la composition de la cuticule est variable en fonction des espèces, et peut également différer entre les deux faces foliaires. Elle assure une protection physique des cellules épidermique et limite fortement leur perte d'eau par évaporation. La surface du limbe peut être ornée de structures uni ou pluri-cellulaires (vivantes ou non), constituant des extensions de l'épiderme : les trichomes. Ces structures dressées forment une pilosité de taille et de densité très variable. La pilosité peut modifier l'écoulement de l'air au niveau de la surface foliaire (Nobel, 1991).

1.2.1.2 : Stomates

L'épiderme est parsemé de structures cellulaires spécialisées : les stomates, formant des pores permettant les échanges de gaz entre l'atmosphère et le mésophylle. Ils sont constitués de deux cellules de garde chlorophylliennes, entourées de cellules épidermiques adjacentes non chlorophylliennes (cellules subsidiaires) dont la structure morphologique diffère des cellules épidermiques ordinaires. Le pore est formé par les deux cellules de garde, et son ouverture est modulée par les variations de turgescence de ces dernières. Le stomate à pleine ouverture forme typiquement un pore d'une longueur de $20\mu\text{m}$ et d'une largeur de 5 à $15\mu\text{m}$ (Nobel, 1991). Le rôle physiologique des stomates est de permettre l'entrée du CO_2 tout en minimisant

Figure 1.3 : Coupe paradermale dans le parenchyme palissadique d'une feuille de *Phaseolus vulgaris* observée par microscopie optique. Légende : I = espaces intercellulaires, CH = chloroplastes. La barre représente 50µm. Tiré de Bolhar-Nordenkampf & draxler, 1993.

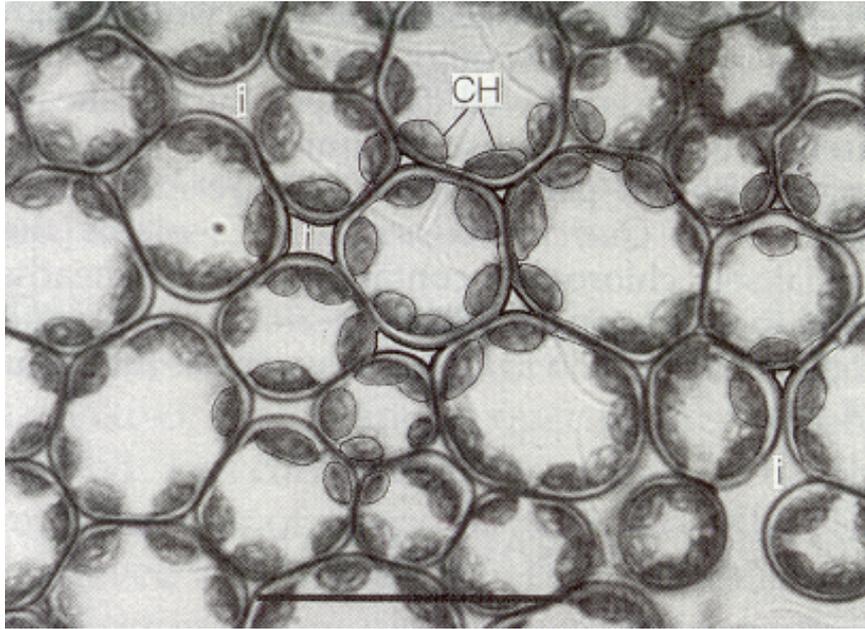
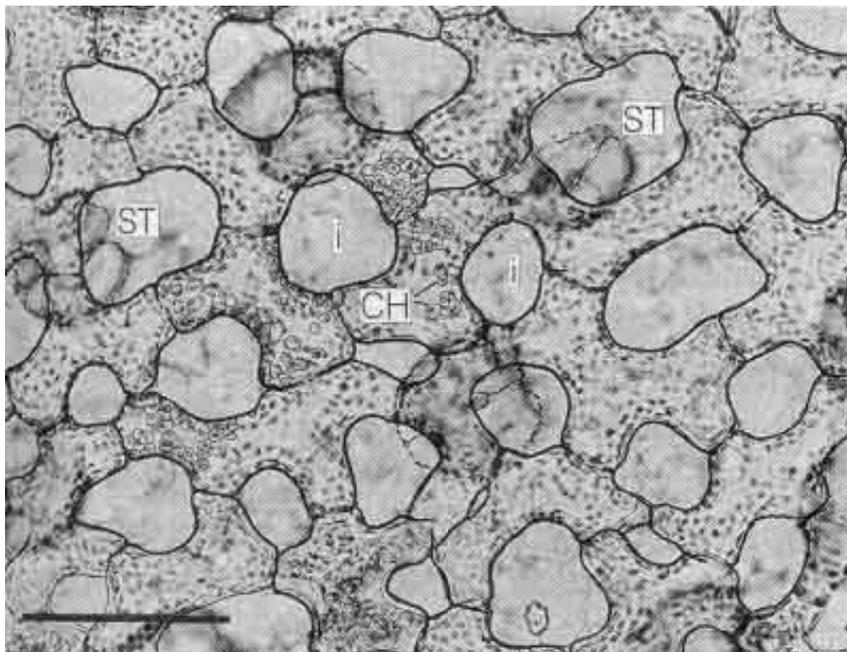


Figure 1.4 : Coupe paradermale dans le parenchyme lacuneux d'une feuille d'*Heleborus niger* observée par microscopie optique. Légende : I = espaces intercellulaires, ST = stomate vu depuis l'intérieur de la feuille, CH = chloroplastes. La barre représente 50µm. Tiré de Bolhar-Nordenkampf & draxler, 1993.



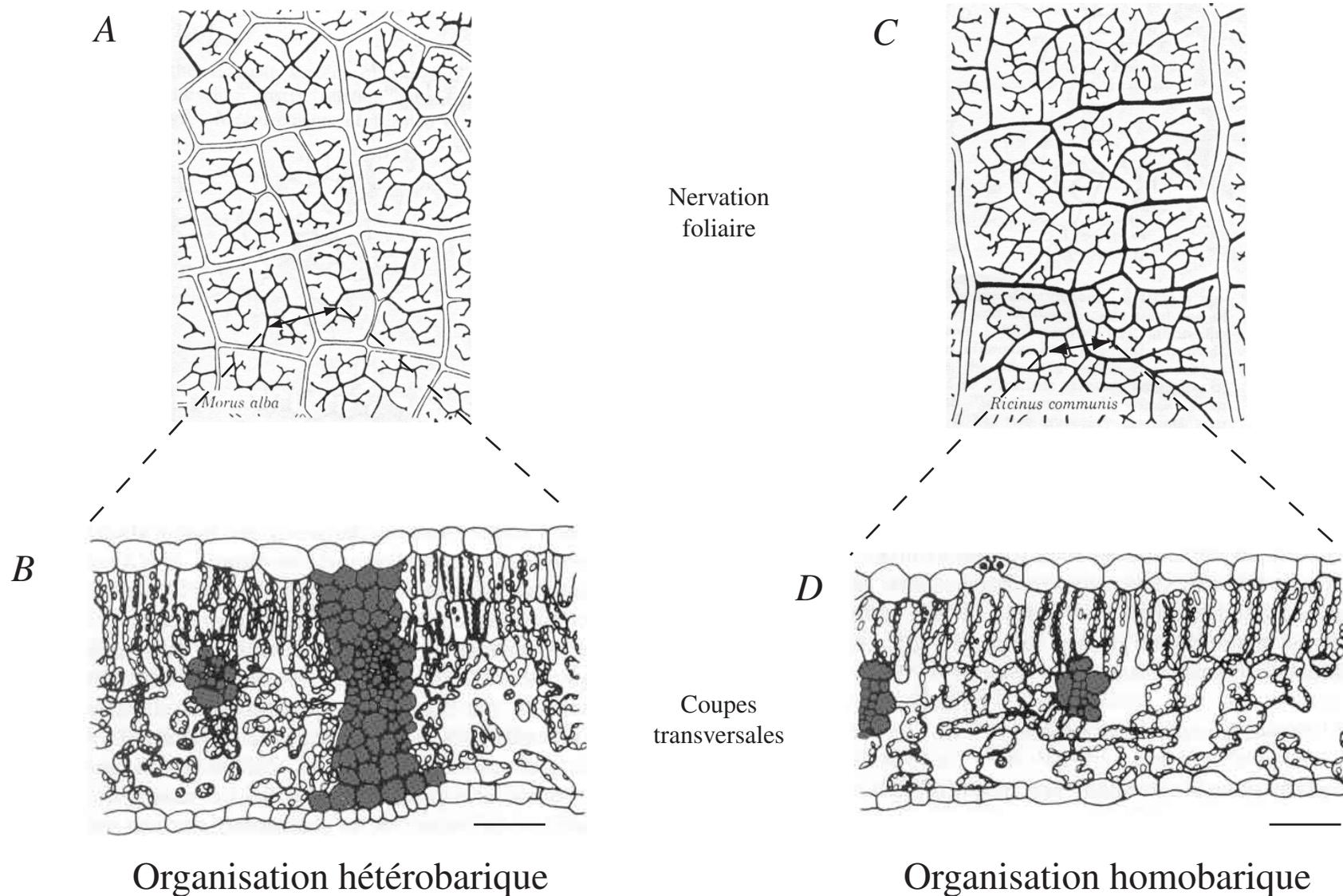
et régulant la perte d'eau par transpiration. L'ouverture du pore stomatique est variable en fonction de l'environnement physique ou en fonction de signaux internes à la plante. L'ouverture stomatique est stimulée par l'éclairement, et se ferme à l'obscurité. Une réponse à la qualité de l'éclairement (lumière bleue, permettant une ouverture stomatique en début de journée, avant l'activation de la photosynthèse), peut être distinguée d'une réponse à la quantité d'éclairement liée à l'activité photosynthétique (Sharkey et Raschke, 1981). L'ouverture des stomates est également modulée par la pression partielle de CO₂ des espaces intercellulaires du mésophylle : une faible pression partielle de CO₂ stimule l'ouverture, tandis qu'une forte pression partielle induit la fermeture. Une forte transpiration foliaire induit également une fermeture partielle des stomates (Mott, 1991). D'autres facteurs externes comme la température sont également en mesure d'affecter l'ouverture stomatique. Les stomates sont également sensibles à des signaux internes, en particulier liés à l'état hydrique de la plante. L'existence de signaux "hormonaux" en provenance des racines ou de la feuille (comme l'acide abscissique) a ainsi pu être mise en évidence. Le degré d'ouverture des stomates est la résultante de l'action conjuguée de tous ces effecteurs, qui peuvent avoir une action antagoniste ou synergique.

La densité des stomates et leur répartition entre les deux surfaces du limbe est variable selon les espèces, ou en réponse à l'environnement. Les feuilles peuvent posséder des stomates uniquement sur leur face abaxiale (feuilles hypostomes), soit sur leurs deux faces (feuilles amphistomes). D'une manière générale, les ligneux sont majoritairement hypostomes (ou amphistomes avec une majorité de stomates sur la face abaxiale) et les herbacées majoritairement amphistomes (Kelly et Beerling, 1995). Les stomates peuvent dans certains cas être positionnés dans des invaginations de l'épiderme (cryptes), comme par exemple chez le laurier rose.

1.2.1.3 : Mésophylle

L'espace contenu entre les deux épidermes contient le tissu photosynthétiquement actif et les éléments conducteurs de sève. Beaucoup d'herbacées monocotylédones ont un mésophylle homogène tandis que la plupart des dicotylédones possèdent un parenchyme palissadique et un parenchyme lacuneux (Bolhàr-Nordenkampf et Draxler, 1993). Le parenchyme palissadique se trouve du côté adaxial et possède des cellules chlorophylliennes en forme de bâtonnet arrangées de manière compacte (figure 1.3). Le parenchyme lacuneux est positionné du côté abaxial, et possède des cellules de formes diverses, arrangées de manière beaucoup

Figure 1.5 : Organisation hétérobarique et homobarique du mésophylle. Les dessins A et C représentent la nervation foliaire. Un double trait représente une nervure possédant des extensions périvasculaires, et un trait épais noir une nervure sans extensions. Les dessins B et D représentent des coupes transversales théoriques effectuées au niveau des traits fléchés. Les éléments vasculaires et leurs extensions sont présentés en grisé. La barre indique 50 µm. Adapté de Esau, 1965 et Terashima, 1989.



plus lâche que le parenchyme palissadique (figure 1.4). La densité de chloroplastes du parenchyme lacuneux est fréquemment moindre que celle du parenchyme palissadique. Le parenchyme lacuneux peut même dans certains cas ne pas être chlorophyllien. La structure du mésophylle influence fortement les propriétés d'absorption de la lumière de la feuille. Le parenchyme palissadique reçoit la plus grande partie de l'éclairement, et est le lieu de la majeure partie de l'assimilation du CO₂ (Evans, 1999, Nishio, *et al.*, 1993, Terashima, 1989, Terashima et Saeki, 1983). Il a été également montré que la structure géométrique des cellules du parenchyme palissadique favorise la diffusion de la lumière vers les couches plus profondes du mésophylle (Vogelmann et Martin, 1993).

Le mésophylle contient un réseau d'espaces gazeux entre ses cellules. La proportion d'espaces gazeux intercellulaires n'est pas uniformément répartie dans le mésophylle. Le parenchyme lacuneux présente une plus forte proportion d'espaces gazeux que le parenchyme palissadique. Ainsi, la fraction de volume d'espaces gazeux mesurée sur une feuille d'*Arbutus menziesii* est de 16,5% dans le parenchyme palissadique et de 39,4% dans le parenchyme lacuneux (Parkhurst, 1986). D'une manière générale, on estime que les espaces gazeux représentent de 10 à 40% du volume du parenchyme palissadique et entre 50 et 80% pour le parenchyme lacuneux (Nobel, 1991). La fraction volumique d'espaces gazeux du limbe est également très variable entre les espèces : une étude récente réalisée sur 52 ligneux a montré que ces espaces représentent 15 à 54% du volume du limbe (Castro-Diez, *et al.*, 2000). La surface de mésophylle exposée aux espaces gazeux intercellulaire (S_{mes}) constitue la surface utile maximale de la feuille pour les échanges de CO₂. Cette surface est largement supérieure à la surface foliaire (S_F), le rapport S_{mes}/S_F variant généralement entre 10 et 50 (Nobel, 1991). Nobel, 1991 a également estimé que les 2/3 de S_{mes} sont constitués par le parenchyme palissadique, et que 3/4 de la surface d'échange des cellules palissadiques est constituée par les paroi latérales de ces cellules cylindriques, exposée aux étroits canaux gazeux intercellulaires.

Les éléments vasculaires peuvent, ou non, cloisonner le mésophylle et empêcher la continuité des espaces gazeux sur le plan paradermal. Deux grands types d'organisation du mésophylle peuvent être décrites : les organisations homobarique et hétérobarique (Esau, 1965). Une organisation homobarique désigne un mésophylle non cloisonné par les extensions cellulaires des éléments vasculaires (extensions périvasculaires), tandis qu'une organisation hétérobarique désigne un mésophylle cloisonné par ces extensions (figure 1.5). La surface foliaire délimitée par les éléments vasculaires est nommée aréole.

Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure d'une cellule mésophyllienne d'une plante supérieure. Les chloroplastes, lieu de l'assimilation du CO₂, sont localisés contre la membrane plasmique. D'après Nobel, 1991.

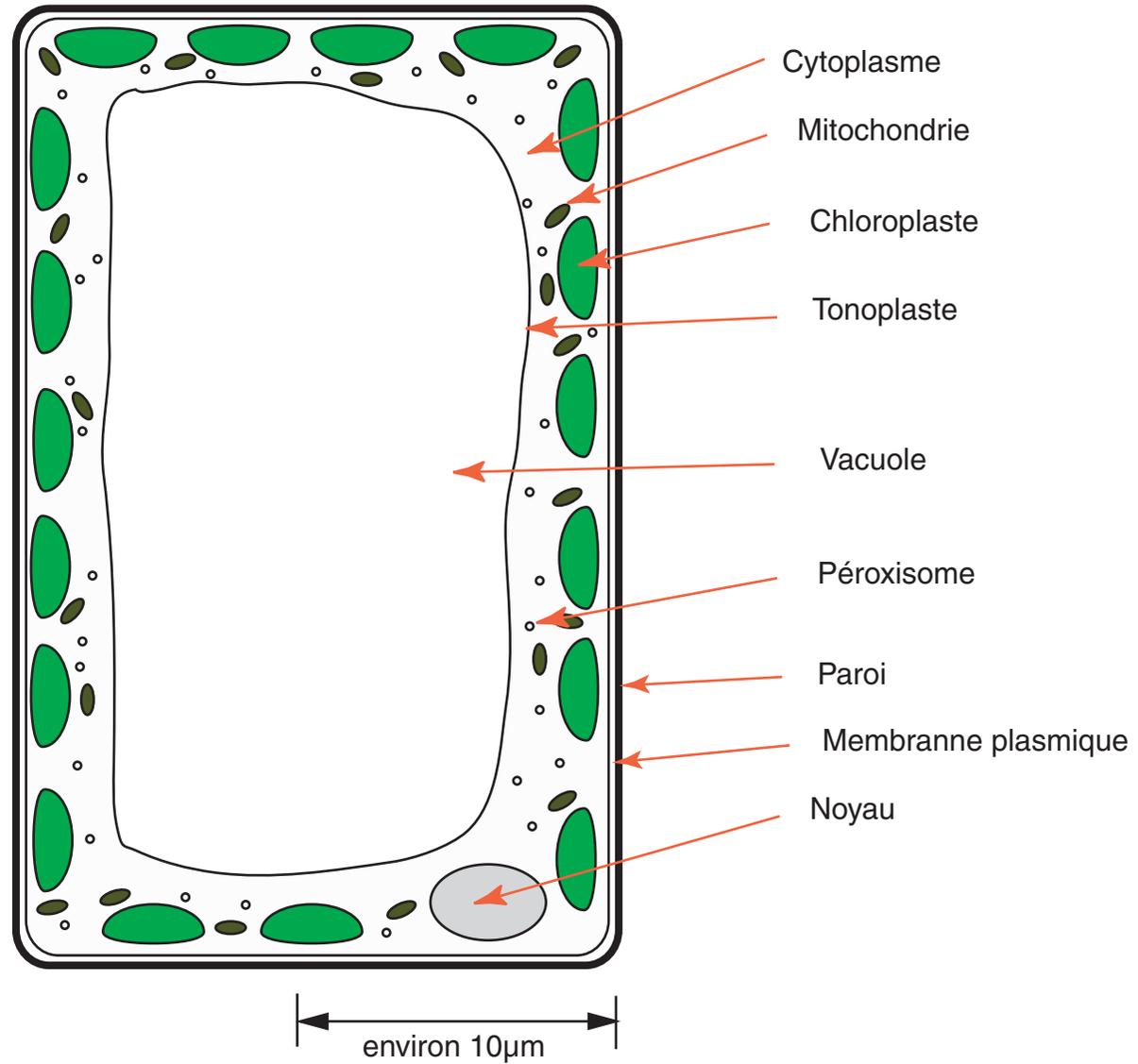
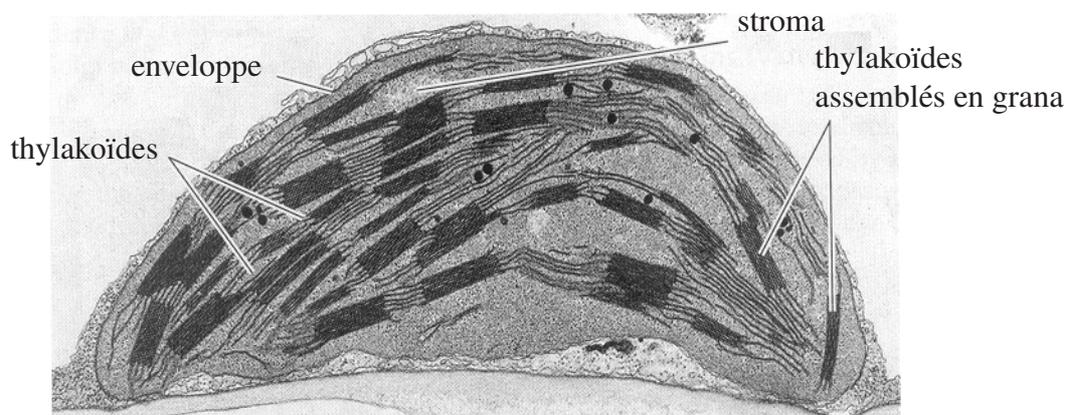


Figure 1.7 : Photographie d'une coupe de chloroplaste réalisée en microscopie électronique par transmission. Le chloroplaste a été isolé à partir de feuilles de *Phleum pratense*. Le grossissement est de 18000 fois. Tiré de Taiz & Zeiger, 1998.



1.2.1.4 : Organisation d'une cellule assimilatrice

Principales structures cellulaires impliquées dans les échanges de CO₂

La structure schématique d'une cellule assimilatrice est présentée dans la figure 1.6. La cellule est entourée d'une paroi qui est accolée à la membrane plasmique, et composée de 25 à 50% de cellulose, ainsi que de pectine, de lignine, et de quelques protéines. Elle est de nature hydrophile et est chargée négativement. Les flux d'eau et de solutés de la cellule transitent par la paroi, laquelle offre une grande perméabilité aux petites molécules. Son épaisseur varie généralement de 0,1 à 10 μm d'épaisseur (Nobel, 1991). C'est une structure rigide, dont les fonctions sont nombreuses chez les végétaux. Elle offre en particulier un support mécanique à la cellule (particulièrement important lors des variations de potentiel hydrique cellulaire) et sa structure détermine la forme et la taille de la cellule. La paroi est baignée par une phase aqueuse : l'apoplaste, par laquelle transitent les solutés échangés par la cellule.

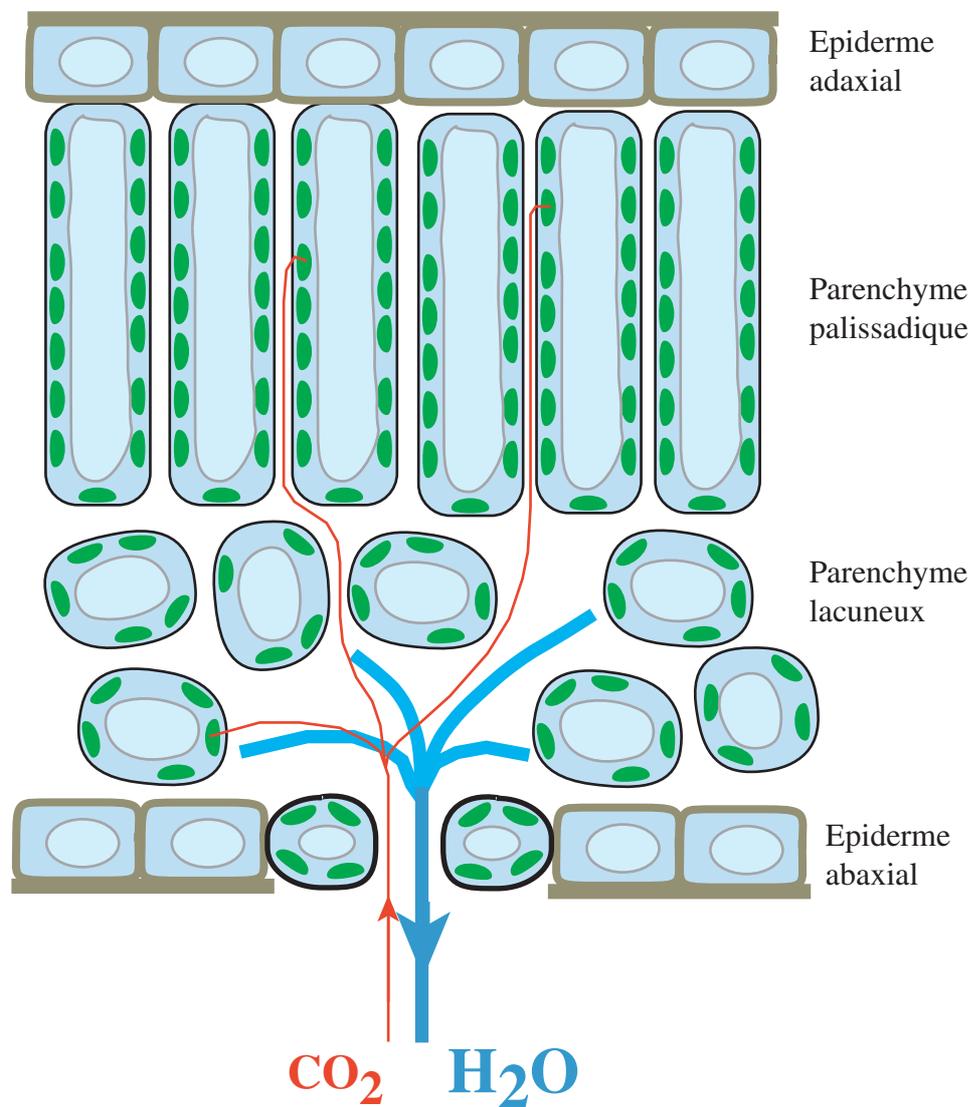
La membrane plasmique est une membrane biologique séparant le milieu intracellulaire (cytoplasme) de la paroi. La perméabilité de cette membrane varie de manière très importante en fonction des molécules en solution. La présence de transporteurs et de canaux en fait un des principaux points de contrôle des échanges entre le milieu intracellulaire et l'apoplaste.

La structure la plus visible du cytoplasme est la vacuole, laquelle peut représenter jusqu'à 90% du volume cellulaire. C'est une phase aqueuse séparée du cytoplasme par une membrane (tonoplaste) et contenant principalement des solutés.

Les réactions photochimiques et biochimiques de fixation du CO₂ se déroulent dans les chloroplastes. Leur taille est généralement comprise entre 3 et 10 μm , et leur nombre par cellule est très variable (généralement de 20 à 60, Hopkins, 1995). La structure du chloroplaste est présentée dans la figure 1.7. Il possède une enveloppe composée de deux membranes, un milieu aqueux interne : le stroma, et contient un réseau interne de membranes structuré en thylakoïdes. Les réactions photochimiques ont lieu dans les membranes de ces thylakoïdes, et les réactions biochimiques de fixation du CO₂ dans le stroma.

Les mitochondries sont des organites d'environ 1 μm , qui sont le siège de la (photo)respiration (*cf.* I.2.2). Elles permettent l'oxydation de composés glucidiques permettant la production d'ATP et de composés réducteurs utilisés pour les synthèses biochimiques. Elles sont également le siège de voies biochimiques nécessaires au fonctionnement cellulaire. Des échanges ont lieu entre les chloroplastes et les mitochondries, comme par exemple lors du cycle photorespiratoire (*cf.* I.2.1).

Figure 1.8 : Schéma de coupe transversale foliaire, sur lesquels sont superposés les trajets théoriques de diffusion de la vapeur d'eau (trait épais bleu) et du CO_2 (trait fin rouge). La phase liquide est figurée en bleu, et les chloroplastes en vert. La vapeur d'eau diffuse depuis la cavité sous stomatique vers l'atmosphère, tandis que le CO_2 diffuse en sens inverse, depuis l'atmosphère jusqu'à la Rubisco dans les chloroplastes. Le flux sortant d'eau est largement supérieur au flux entrant de CO_2 .



Des vésicules sont également présentes dans le cytoplasme : les péroxysomes, ayant un rôle métabolique (en particulier dans la photorespiration).

Localisation et mobilité des Chloroplastes

Les chloroplastes peuvent modifier leur position dans la cellule en fonction de deux contraintes : l'interception de la lumière et la disponibilité du CO₂. Les chloroplastes sont en mesure de modifier leur orientation en fonction de l'intensité de l'éclairement et de sa direction. Cette réorientation des chloroplastes est à l'origine de changements de transmittance foliaire. Les mouvements des chloroplastes ont pu être interprétés comme une optimisation de l'interception de l'éclairement, et comme une protection contre une intensité lumineuse trop élevée (Haupt, 1982, Haupt et Scheuerlein, 1990). Les chloroplastes s'organisent également de manière adjacente aux parois exposées aux espaces gazeux intercellulaires, aussi bien dans les cellules du parenchyme palissadique que du parenchyme lacuneux (Psaras, 1986, Psaras, *et al.*, 1996). Dans ces conditions, le trajet de diffusion du CO₂ jusqu'à la Rubisco est minimisé.

I.2.2 : Diffusion des gaz dans le mésophylle au cours de la photosynthèse

I.2.2.1 : Trajet de diffusion de la vapeur d'eau

La vapeur d'eau diffuse selon un gradient de pression partielle entre les espaces gazeux (considérés comme saturés en vapeur d'eau) sous-stomatiques et l'atmosphère environnant la feuille, comme illustré dans la figure 1.8. La diffusion débute dans les espaces gazeux intercellulaires (lesquels sont considérés comme saturés en vapeur d'eau). On considère généralement que seule une fraction de la surface cellulaire exposée aux espaces gazeux est disponible pour l'évaporation. Il est en effet généralement postulé que l'eau transpirée provient majoritairement des surfaces cellulaires située à proximité immédiate des stomates et de la cavité sous stomatique (voir Parkhurst, 1994). La cuticule opposant une résistance très élevée à la diffusion de la vapeur d'eau (Boyer, *et al.*, 1997, Nobel, 1991), l'eau diffuse suivant un chemin offrant une moindre résistance à travers les pores stomatiques. Les stomates permettent ainsi le flux, et les variations d'ouverture permettent à la plante de moduler, voire de stopper la transpiration. Enfin, la vapeur d'eau doit franchir la couche limite (couche d'air "stable" adjacente à l'épiderme, dont l'écoulement est considéré comme laminaire) avant

d'atteindre l'atmosphère (régime d'écoulement turbulent). La limitation opposée par la couche limite diminue avec la vitesse du vent, et est plus faible pour les feuilles de petite taille (Nobel, 1991). Elle est augmentée par une forte pilosité de l'épiderme, ou par une localisation des stomates dans des invaginations de l'épiderme comme par exemple les cryptes stomatiques de *Nerium oleander*.

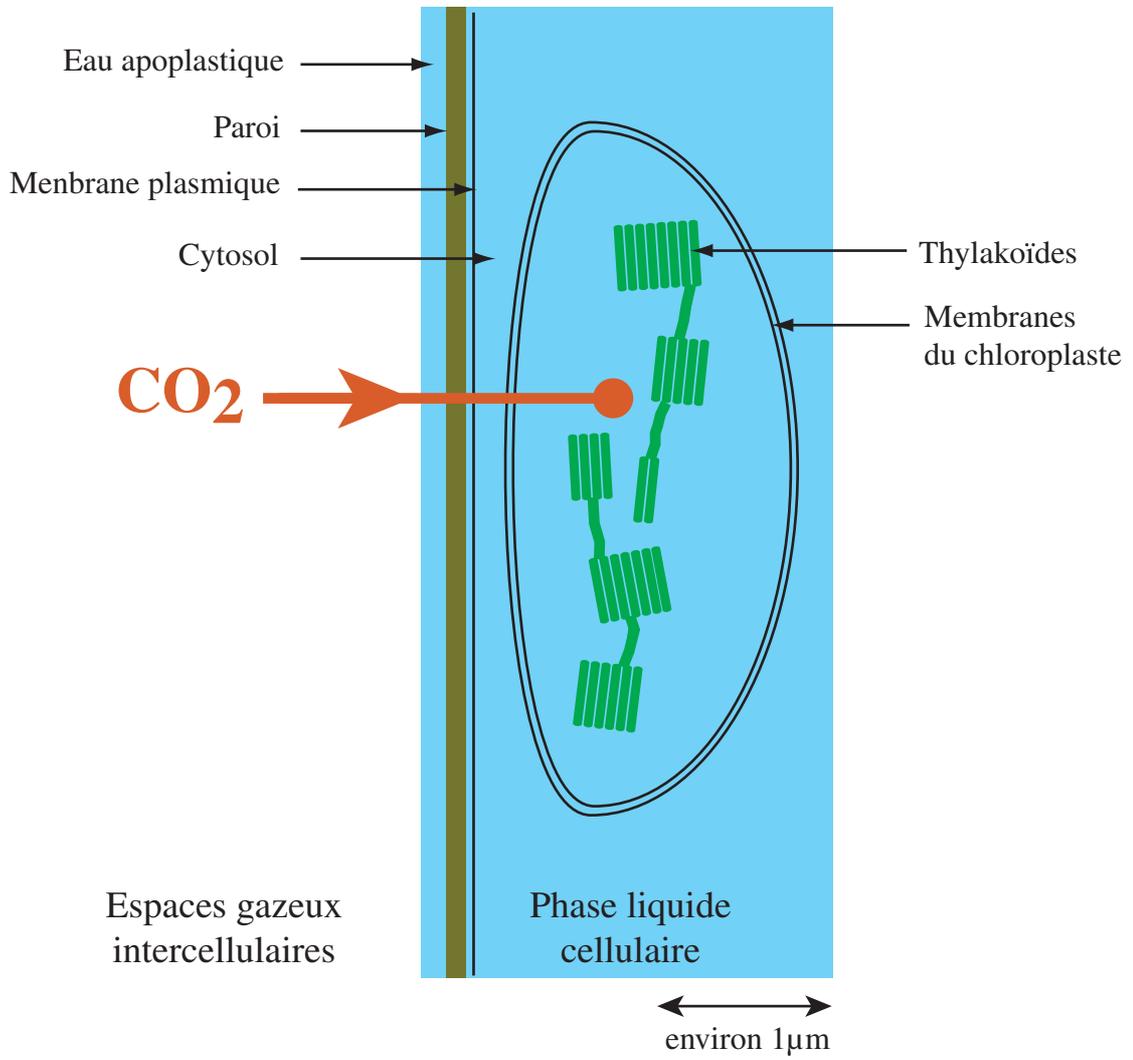
1.2.2.2 : Trajet de diffusion du CO₂

Le CO₂ diffuse selon un gradient de pression partielle entre l'atmosphère et les sites enzymatiques de carboxylation de la Rubisco dans les chloroplastes des cellules assimilatrices du mésophylle. Deux grandes étapes de sa diffusion doivent être distinguées : (i) la diffusion dans la phase gazeuse intercellulaire intervenant sur une longue distance dans un espace en trois dimensions, (ii) puis la diffusion en phase liquide, intervenant sur une distance très courte dans la cellule.

Diffusion en phase gazeuse

Les molécules de CO₂ doivent tout d'abord franchir la couche limite, puis les stomates, pour arriver au niveau des espaces évaporants intercellulaires. Cette partie de son trajet de diffusion est commun (mais en sens inverse) avec celui de la vapeur d'eau, et les limitations opposées à la vapeur d'eau affectent également la diffusion du CO₂. Le flux de transpiration étant très supérieur (environ mille fois) au flux de CO₂ assimilé, il y a un effet d'entraînement par les molécules d'H₂O qui interagissent avec les molécules de CO₂ circulant en sens inverse (Jarman, 1974), ce qui augmente la limitation opposée à la diffusion du CO₂. Le trajet commun avec la vapeur d'eau est fini une fois les stomates franchis et le CO₂ parvenu au niveau des sites évaporants intercellulaires. Le CO₂ doit diffuser ensuite dans un réseau tortueux en trois dimensions d'espaces gazeux intercellulaires jusqu'aux parois des cellules assimilatrices. La distance de diffusion dans les larges espaces gazeux du parenchyme lacuneux et / ou les étroits canaux intercellulaires du parenchyme palissadique peut ainsi être largement supérieure à l'épaisseur du mésophylle (Parkhurst, 1994, Syvertsen, *et al.*, 1995). Cette situation est favorable à l'apparition de gradients de pression partielle de CO₂ entre plusieurs zones du mésophylle, et ainsi d'opposer une limitation à la diffusion du CO₂ (*cf.* Parkhurst, 1994 pour une revue).

Figure 1.9 : Trajet de diffusion du CO₂ dans la phase liquide cellulaire et structure du chloroplaste.
Les chloroplastes sont accolés à la membrane plasmique.



Considérant que le CO₂ est majoritairement assimilé dans le parenchyme palissadique, la répartition des stomates entre les deux faces foliaires affecte la distance moyenne de diffusion du CO₂, et donc potentiellement la limitation à sa diffusion. Ainsi, chez les feuilles bifaciales amphistomes, le CO₂ peut accéder directement aux assises palissadiques par la face adaxiale, tandis que dans le cas de feuilles bifaciales hypostomes (majorité des ligneux), le trajet de diffusion moyen des molécules de CO₂ est plus long, car il passe obligatoirement par le parenchyme lacuneux (Parkhurst, 1986).

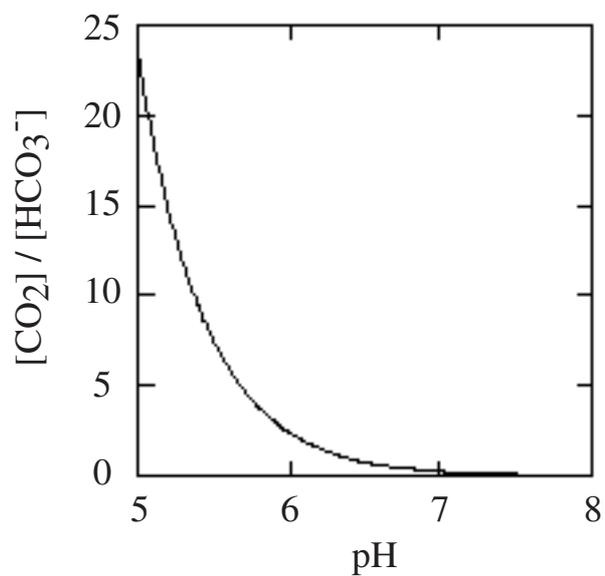
D'autre part, une ouverture non uniforme des pores stomatique sur la surface foliaire, peut favoriser l'apparition d'un gradient latéral de pression partielle de CO₂. Un tel comportement stomatique peut résulter par exemple d'une contrainte hydrique ou d'un signal hormonal comme l'acide abscissique (Daley, *et al.*, 1989, Downton, *et al.*, 1988a, Downton, *et al.*, 1988b, Meyer et Genty, 1998, Mott, 1995, Mott, *et al.*, 1993, Raschke, *et al.*, 1990, Terashima, *et al.*, 1988). Dans le cas de feuilles homobariques, le mésophylle n'est pas cloisonné et la diffusion entre aréoles est possible, ce qui permet la diffusion du CO₂ d'une zone où les stomates sont ouverts vers une zone où ils sont fermés. À l'opposé, dans le cas de feuilles hétérobariques, la diffusion latérale est rendue impossible par le cloisonnement du mésophylle. Ce dernier cas favorise l'apparition de zones (aréoles) ayant une pression partielle de CO₂ dans les espaces gazeux intercellulaires différentes, et une répartition hétérogène de l'assimilation du CO₂ sur la surface foliaire (*cf.* Terashima, 1992 pour une revue).

Diffusion en phase liquide

Le coefficient de diffusion du CO₂ à 25°C est environ 9000 fois inférieur dans l'eau que dans l'air (Nobel, 1991). Par conséquent, la diffusion du CO₂ est beaucoup plus difficile dans la phase liquide. Toutefois, la distance de diffusion du CO₂ en solution (de l'ordre du micromètre) est très largement inférieure à celle en phase gazeuse. Jusqu'à aujourd'hui, aucun mécanisme de transport actif du CO₂ n'a pu être mis en évidence chez les plantes terrestres de type C3. On considèrera donc que le cheminement du CO₂ dans la cellule se fait uniquement par diffusion. Les étapes de la diffusion du CO₂ dans la phase liquide sont résumées dans la figure 1.9.

Une fois parvenu au niveau des paroi cellulaires, le CO₂ passe en solution dans la phase liquide apoplastique liée au parois cellulaires. Le CO₂ dans l'eau peut se trouver sous trois formes : CO₂, HCO₃⁻ et CO₃⁻. La concentration de carbone inorganique (CO₂ + HCO₃⁻ + CO₃⁻) dissous dépend de la pression partielle de CO₂ dans la phase gaz et de la température (loi de

Figure 1.10 : Rapport des concentration du CO_2 et de l' HCO_3^- en fonction du pH à 25°C (d'après Nobel, 1991). La concentration totale de ces deux espèces est par contre indépendante du pH.

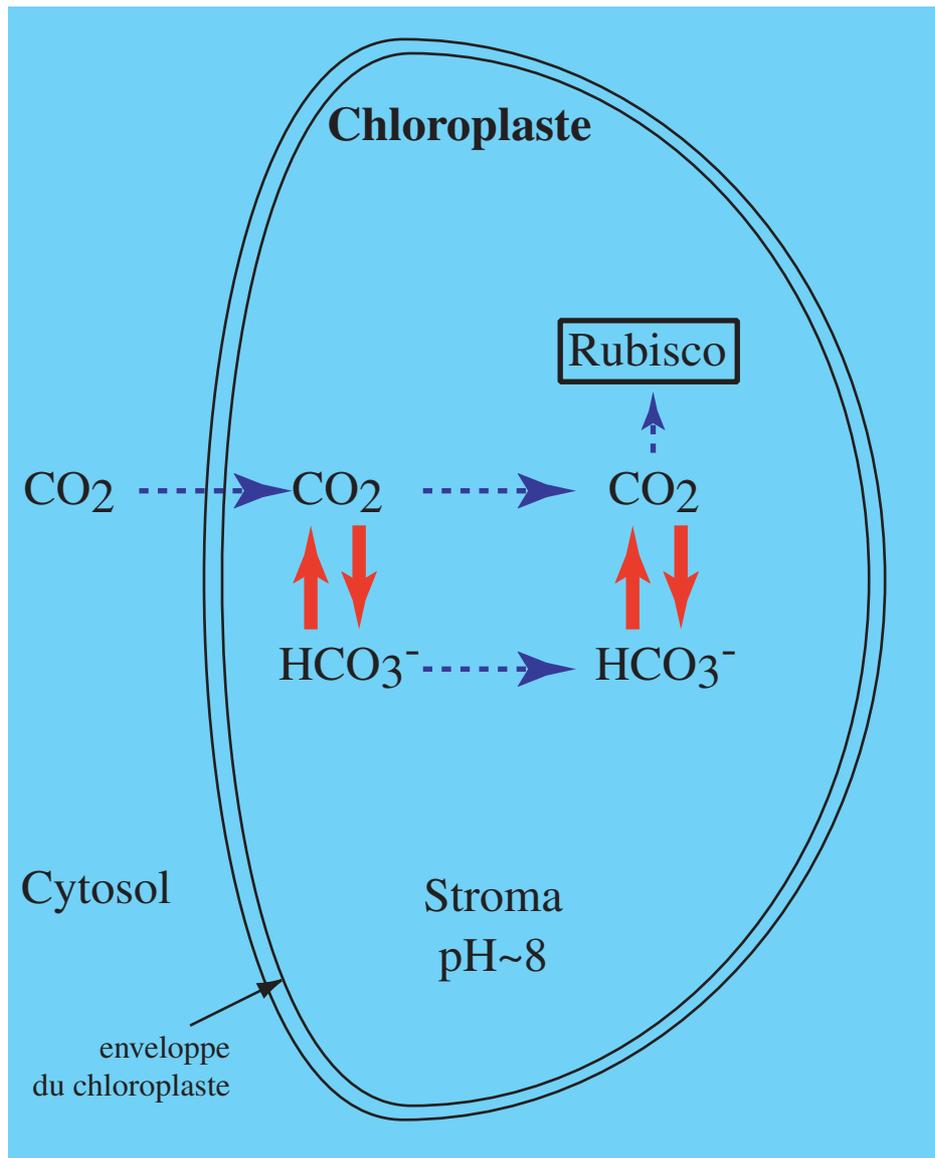


Henry), et est indépendante du pH. Dans la gamme de pH physiologique (inférieur à pH 8), les formes prédominantes sont le CO_2 et HCO_3^- , et le CO_3^- peut être négligé car le pK de la dissociation $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ est de 6,33 à 25°C, tandis que celui de la dissociation $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^-$ est de 10,38 (Stumm et Morgan, 1996). Une enzyme, l'anhydrase carbonique, facilite l'équilibre entre CO_2 et HCO_3^- . Sa localisation est considérée comme majoritairement chloroplastique (voir Moroney, *et al.*, 2001 pour une revue). Les propriétés de diffusion de ces deux espèces ne sont pas les mêmes dans la cellule, car la forme non ionisée (CO_2) franchit les membranes biologiques beaucoup plus facilement que les formes ionisées (Nobel, 1991).

Les conditions dans l'apoplaste lié à la paroi sont acides, et le pH se situe dans la gamme pH=5 à 6,5 (Grignon et Sentenac, 1991, Pfanz et Dietz, 1986). Dans ces conditions, le rapport de concentrations entre CO_2 et HCO_3^- varie entre 23 et 1 environ (figure 1.10). Les deux espèces peuvent diffuser dans la paroi, mais seul le CO_2 peut franchir la membrane plasmique. A ce niveau, la conversion de HCO_3^- en CO_2 peut être facilitée chez les plantes possédant une anhydrase carbonique périplasmique (Moroney, *et al.*, 2001). La diffusion se poursuit ensuite dans le cytoplasme, jusqu'à l'enveloppe des chloroplastes. Ces derniers étant accolés à la membrane plasmique et la paroi, le trajet de diffusion cytoplasmique est très court (de 0,1 à 0,3 μm , Nobel, 1991). Le pH cytoplasmique varie entre 7,2 et 7,6 (Pfanz, 1995) et est favorable à la formation d' HCO_3^- (ratio $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ variant entre 7 et 17). Là encore, la présence d'une anhydrase carbonique cytoplasmique (Moroney, *et al.*, 2001) permet d'interconvertir HCO_3^- en CO_2 , qui seul peut diffuser au travers des deux membranes de l'enveloppe du chloroplaste.

Une fois l'enveloppe franchie, la diffusion a lieu dans le stroma jusqu'aux sites de carboxylation de la Rubisco. Dans les conditions de pH du chloroplaste (environ pH 8, Nobel, 1991), l'équilibre $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ est largement en faveur de HCO_3^- (*cf.* figure 1.10). Comme une grande quantité d'anhydrase carbonique est présente dans le stroma plastidial, il a été postulé que cette enzyme puisse avoir un rôle de facilitation de la diffusion du dioxyde de carbone dans le stroma (Cowan, 1986). En effet, après que le CO_2 ai franchi l'enveloppe, l'anhydrase est en mesure d'accélérer sa conversion en HCO_3^- , et ainsi d'atteindre beaucoup plus rapidement l'équilibre. Ainsi, une grande quantité d' HCO_3^- est rapidement formée, ce qui augmente la quantité totale de carbone inorganique ($\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^-$) disponible pour la diffusion. La fourniture de dioxyde de carbone aux sites enzymatiques de la Rubisco n'étant plus dépendante uniquement de la diffusion du CO_2 , mais dépendante également de la diffusion de HCO_3^- , lequel est présent en quantité largement supérieure au CO_2 (*cf.* figure 1.10). Une fois au niveau de la Rubisco, l'anhydrase carbonique est en mesure de faciliter le

Figure 1.11 : Modèle de facilitation de la diffusion du CO_2 par l'anhydrase carbonique, d'après Cowan (1986) et Badger & Price (1994). Les flèches en pointillé correspondent à la diffusion et les flèches pleines à l'interconversion facilitée par l'anhydrase. Seul le CO_2 est théoriquement en mesure de diffuser dans une membrane biologique.



prélèvement du CO_2 par la fonction carboxylase (le substrat de la Rubisco est le CO_2 et non l' HCO_3^-) en accélérant la conversion de l' HCO_3^- en CO_2 . Ainsi, le stock de carbone inorganique dans le chloroplaste devient plus facilement disponible pour la Rubisco. Ce modèle de facilitation est résumé dans la figure 1.11.

Il est également important de noter qu'une part du CO_2 peut être fournie par les mitochondries, avec un trajet de diffusion dans le cytosol, puis au travers de l'enveloppe et du stroma plastidial. Ce "recyclage" du CO_2 issu du cycle de Krebs par les chloroplastes est complexe à étudier et est souvent négligé.

Lien entre surface d'échange de CO_2 et résistance au transfert du CO_2 dans la cellule

Pour une perméabilité au CO_2 donnée d'un élément cellulaire (paroi, membrane), plus la surface d'échange est importante, et plus la résistance au transfert du CO_2 est faible. Maximiser la surface d'échange est ainsi un moyen permettant de contrebalancer la difficulté de la diffusion du CO_2 en phase liquide, ainsi que les faibles perméabilités des constituants cellulaires.

La surface de chloroplaste exposée aux espaces intercellulaires (S_c , autrement dit la surface de chloroplaste exposée aux parois elles même exposées aux espaces intercellulaires) constitue la véritable surface utile de la feuille disponible pour la fixation du CO_2 . S_c est plus faible que la surface de mésophylle exposé aux espaces intercellulaires (S_{mes}) : il a été en effet estimé que la proportion de paroi couverte par des chloroplastes est variable selon les espèces (de 26 à 93%) et n'est pas liée à leur nombre dans la cellule (voir Evans et Loreto, 2000). La variabilité de S_c est donc susceptible d'expliquer une part de la variabilité de la résistance au transfert du CO_2 dans la cellule.

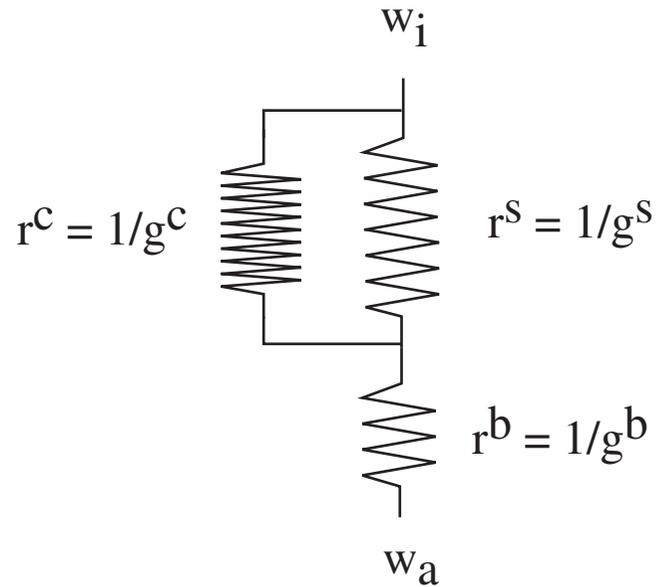
I.3 : Quantification des limitations à la diffusion

I.3.1 : Expression d'une limitation sous la forme d'une conductance

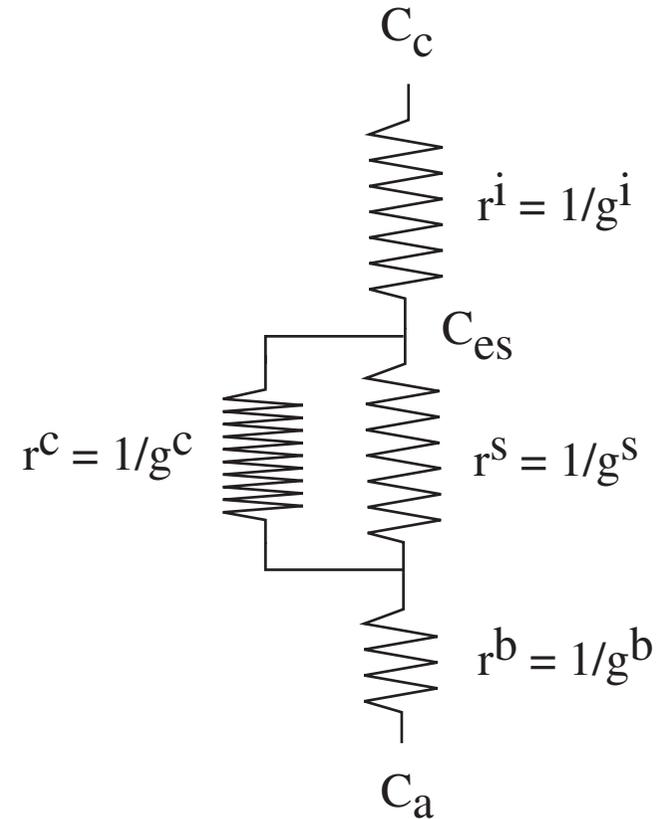
La diffusion d'une molécule par diffusion simple suit un gradient de concentration. En considérant que le système est isobarique et isotherme, elle peut être décrite d'après la première loi de Fick (voir Jarvis, 1971, Nobel, 1991, Parkhurst, 1994) en fonction du gradient de fraction molaire :

Figure 1.12 : Modèles de résistance à la diffusion de la vapeur d'eau et au CO₂. La vapeur d'eau diffuse selon un gradient de fraction molaire entre les espaces évaporant intercellulaire (w_i) et l'air ambiant (w_a). Le CO₂ diffuse selon un gradient de fraction molaire entre l'air ambiant (C_a) et les sites enzymatiques de la Rubisco (C_c).

Résistances à la vapeur d'eau



Résistances au CO₂



g^b et r^b : conductance et résistance de couche limite
 g^c et r^c : conductance et résistance cuticulaire
 g^s et r^s : conductance et résistance stomatique
 g^i et r^i : conductance et résistance interne

$$F = -D \frac{dC}{dx} \quad (1.1)$$

F étant la densité de flux de la molécule considérée, D la diffusivité dans un gaz donné (l'air), x l'axe de diffusion, et C sa concentration. Gaastra en 1959 (voir Nobel, 1991) a introduit un modèle simple basé sur la première loi de Fick pour décrire la diffusion simple d'une molécule entre deux points d'après la relation :

$$F = \frac{C_1 - C_2}{r} \quad (1.2)$$

C_1 et C_2 étant respectivement les concentrations de départ et finales de la molécule considérée, et r la résistance à la diffusion de la molécule entre deux points 1 et 2. Le système étudié étant isobarique et isotherme, des fractions molaires peuvent être utilisées à la place des concentrations. L'expression (1.2) peut être utilisée pour décrire les flux d'eau et de CO_2 en bâtissant un réseau de résistances. D'une manière générale, la notion de conductance est préférée par les physiologistes à celle de résistance, car d'une part l'unité de la conductance est la même que celle du flux, et d'autre part les conductances sont corrélées positivement aux flux associés. En remplaçant r par une conductance $g=1/r$, l'expression (1.2) devient :

$$F = g(C_1 - C_2) \quad (1.3)$$

Il est important de remarquer que ces expressions ne sont utilisables que si l'on considère qu'il n'existe ni puits, ni sources de la molécule considérée entre les points 1 et 2.

I.3.2 : Conductances à la diffusion du CO_2 et à la vapeur d'eau

I.3.2.1 : Conductances à la vapeur d'eau

La vapeur d'eau diffuse selon un gradient de concentration entre les sites évaporants du mésophylle et l'air ambiant environnant la feuille. D'après la relation (1.3) la conductance foliaire à la vapeur d'eau peut être décrite de la manière suivante :

$$g_w^t = \frac{E}{(w_{es} - w_a)} \quad (1.4)$$

ou E est la densité de flux d'eau transpiré par la feuille, g_w^t est la conductance totale foliaire à la vapeur d'eau, w_{es} la fraction molaire de vapeur d'eau aux sites évaporants de la cavité sous stomatique et w_a la fraction molaire de vapeur d'eau de l'air.

Trois conductances sont utilisées pour décrire la diffusion de la vapeur d'eau (figure 1.12) :

(i) la conductance de couche limite (g_w^b), qui a la propriété d'être variable en fonctions des

paramètres modifiant l'écoulement gazeux à la surface de la feuille, (ii) la conductance stomatique (g_w^s), qui est variable en fonction du degré d'ouverture des stomates, (iii) la conductance cuticulaire (g_c^s), considérée comme négligeable devant les deux autres conductances lorsque les stomates sont ouverts. En considérant que les résistances stomatiques ($1/g_w^s$) et de couche limite ($1/g_w^b$) sont placées en série, on peut écrire :

$$\frac{1}{g_w^t} = \frac{1}{g_w^b} + \frac{1}{g_w^s} \quad (1.5)$$

1.3.2.2 : Conductances au CO_2

Le CO_2 diffuse entre l'atmosphère et les sites enzymatiques de carboxylation de la Rubisco. Trois conductances sont analogues avec celles de la vapeur d'eau (figure 1.12) : les conductances de couche limite, stomatique et cuticulaire. De la même manière que pour la vapeur d'eau, on peut négliger la conductance cuticulaire devant les autres conductances lorsque les stomates sont ouverts (de plus, la conductance cuticulaire au CO_2 est beaucoup plus faible que celle à la vapeur d'eau, Boyer, *et al.*, 1997). A ces conductances vient s'ajouter la conductance interne, qui quantifie la limitation à la diffusion du CO_2 entre les sites évaporants intercellulaires et la Rubisco dans le chloroplaste. On peut ainsi écrire :

$$\frac{1}{g_c^t} = \frac{1}{g_c^b} + \frac{1}{g_c^s} + \frac{1}{g^i} \quad (1.6)$$

g_c^t étant la conductance foliaire totale au CO_2 , g_w^b la conductance de couche limite au CO_2 , g_c^s la conductance stomatique au CO_2 et g^i la conductance interne.

La conductance interne peut elle même être décomposée en plusieurs conductances. On peut ainsi distinguer la conductance au CO_2 dans le réseau d'espaces gazeux de la feuille (entre les sites évaporants et la paroi des cellules assimilatrices), de la conductance au CO_2 dans la phase liquide cellulaire :

$$\frac{1}{g^i} = \frac{1}{g^{ias}} + \frac{1}{g^{liq}} \quad (1.7)$$

g^{ias} étant la conductance en phase gazeuse et g^{liq} la conductance dans la phase liquide cellulaire. Certains auteurs ont également proposé de décomposer la conductance en phase liquide en plusieurs composantes (Evans, *et al.*, 1994, Nobel, 1991). En effet, une fois solubilisé dans l'eau liée à la paroi, le CO_2 doit franchir la paroi (conductance de la paroi : g^{paroi}), la membrane plasmique (g^{mb}), le cytosol (g^{cyt}), l'enveloppe chloroplastique (g^{chl}), puis une partie du stroma (g^{str}). Ainsi :

$$\frac{1}{g^{liq}} = \frac{1}{g^{paroi}} + \frac{1}{g^{mb}} + \frac{1}{g^{cyt}} + \frac{1}{g^{chl}} + \frac{1}{g^{str}} \quad (1.8)$$

1.3.2.3 : Autres approches pour quantifier la limitation de la diffusion du CO₂ dans le mésophylle

L'utilisation de ce concept de conductance pour quantifier la limitation au CO₂ dans le mésophylle a été critiquée. En particulier, le modèle de Gaastra suppose une absence de gradient sur le plan paradermal dans la feuille, et une absence de source et de prélèvement de CO₂ entre les points de départ et final du trajet de diffusion considéré. Ces hypothèses sont correctes si l'on considère la diffusion du CO₂ par le pore stomatique et dans la couche limite, mais sont discutables lors de la diffusion du CO₂ dans le mésophylle.

En effet, il y a un prélèvement de CO₂ tout le long de son trajet gazeux dans le mésophylle (les assises lacuneuse et palissadique sont généralement toutes deux assimilatrices) ainsi que des sources de CO₂ (respiration). De plus, des gradients de CO₂ sur le plan paradermal peuvent exister dans la phase gazeuse du mésophylle, en particulier lors d'une hétérogénéité de l'ouverture des stomates sur la surface de la feuille (*cf.* 1.2.2.2). Les travaux de modélisation de Parkhurst, 1994, suggèrent également que pour une feuille hypostome ayant des stomates ouverts de manière uniforme mais très espacés sur l'épiderme, la fraction molaire de CO₂ n'est pas uniformément répartie dans le mésophylle.

Des modèles plus complexes ont ainsi été proposés pour décrire la diffusion du CO₂ en deux ou trois dimensions dans le mésophylle (Aalto, 1998, Pachepsky, *et al.*, 1995, Parkhurst, 1994). Toutefois, la complexité de ces modèles et la difficulté de leur paramétrisation rend leur usage inenvisageable.

I.4 : Couplage d'un modèle du métabolisme photosynthétique et d'un modèle de diffusion du CO₂

I.4.1 : Modèle de Chartier *et al.*

Le modèle de Chartier *et al.* (Chartier, 1966, tel qu'il est décrit dans Chartier et Bethenod, 1977) couple un modèle des réactions biochimiques de fixation du CO₂ et un modèle de diffusion du CO₂. D'après cette approche, les processus déterminants l'assimilation sont : (i)

les processus photochimiques (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique), dépendant de l'éclairement, (ii) les processus biochimiques de carboxylation, exprimé par une "résistance à la carboxylation", et par la concentration en CO₂ aux niveau des sites enzymatiques de la Rubisco, (iii) les processus de diffusion du CO₂ entre l'air ambiant et la Rubisco, et enfin (iv) les processus de photorespiration.

Ce modèle utilise pour sa paramétrisation une "résistance mésophyllienne", qui doit être distinguée de la résistance interne qui est l'objet de cette thèse. Cette "résistance mésophyllienne" du modèle de Chartier *et al.* (notée ici r^m pour éviter toute confusion avec la résistance interne $r^i = 1/g^i$ du modèle de Gaastra) correspond à l'inverse de la pente à l'origine de la relation entre assimilation nette (A_n) et fraction molaire de CO₂ aux sites évaporants intercellulaires (C_{es}) :

$$\frac{dA_n}{dC_{es}} = \frac{1}{r^m} \quad (1.9)$$

r^m comporte une composante diffusive (r^i , assimilable à la résistance interne du modèle de Gaastra) et une composante biochimique (r^x), laquelle n'est pas une résistance à la diffusion. r^m n'est pas constante avec l'éclairement et la concentration en oxygène, à cause des variations de sa composante biochimique r^x . La séparation des composantes diffusives et de carboxylation de r^m est particulièrement complexe, et n'a pas pu être réalisée de manière satisfaisante (voir Jarvis, 1971 ainsi que Prioul et Chartier, 1977 pour une revue).

La modélisation basée sur le modèle de Chartier a été abandonnée au début des années 1980. La limitation par la carboxylation n'est plus décrite comme une résistance, mais d'une manière plus mécaniste prenant en compte la compétition entre le CO₂ et l'O₂ par la Rubisco.

I.4.2 : Modèle de Farquhar *et al.*

Un modèle de photosynthèse pour les plantes en C3 a été développé au début des années 1980 (Farquhar et Von Caemmerer, 1982, Farquhar, *et al.*, 1980). Ce modèle est très utilisé car plus simple et plus facilement paramétrable que le modèle de Chartier *et al.* Il s'agit d'un modèle intégrant les échanges gazeux, les cinétiques enzymatiques des réactions biochimiques liées à la fixation du CO₂, et le flux d'électron dans les membranes photosynthétiques. Le métabolisme photosynthétique y est décrit de manière beaucoup plus mécaniste que dans le modèle de Chartier *et al.* La feuille est considérée comme un milieu homogène (pas de gradient d'éclairement et de CO₂ dans le mésophylle) et les chloroplastes sont supposés fonctionner tous de la même manière. Une synthèse sur la modélisation de la

photosynthèse foliaire et du fonctionnement du modèle de Farquhar *et al.* a été récemment publiée par Von Caemmerer (Von Caemmerer, 2000).

1.4.2.1 : Modélisation des réactions biochimiques

L'assimilation nette de CO₂ par la feuille est déterminée par le prélèvement de CO₂ par l'activité carboxylase de la Rubisco dans le chloroplaste, et par le dégagement de CO₂ dans la mitochondrie par la photorespiration et la respiration liée aux cycle des acides tri-carboxyliques (cycle de Krebs). La stoechiométrie des réactions du cycle de Calvin et de la photorespiration est décrite dans la figure 1.13. Lors du cycle photorespiratoire, la stoechiométrie des réactions est de 0,5 mole de CO₂ libérée pour 1 mole de O₂ fixée. On peut donc décrire la densité de flux net de CO₂ prélevé par la feuille de la manière suivante :

$$A_n = V_c - 0.5 V_o - R_d \quad (1.10)$$

ou V_c et V_o sont respectivement les densités de flux de CO₂ et d'O₂ fixés par la Rubisco, et R_d est la densité de flux de CO₂ libéré par la respiration non liée au cycle photorespiratoire. Il est possible d'exprimer l'équation (1.10) en fonction des flux de CO₂ uniquement :

$$A_n = V_c \cdot (1 - 0,5 \cdot \square) - R_d \quad (1.11)$$

□ étant le ratio V_o / V_c (voir figure 1.13). Ce paramètre est déterminé à la fois par les propriétés cinétiques intrinsèques de la Rubisco, ainsi que par la disponibilité relative de ses deux substrats. Laing, *et al.*, 1974 l'ont explicité de la manière suivante :

$$\square = \frac{V_o}{V_c} = \frac{V_o^{\max} K_c}{V_c^{\max} K_o} \square \frac{O}{C} = \frac{1}{S} \square \frac{O}{C} \quad (1.12)$$

ou V_o^{max} et V_c^{max} sont respectivement les densités maximales de flux de fixation d'O₂ et de CO₂, K_c et K_o sont les constantes de Michaelis-Menten de carboxylation et d'oxygénation, S est la spécificité relative de la Rubisco pour le CO₂ et l'oxygène, et C et O sont respectivement les concentrations de CO₂ et d'O₂ aux sites actifs de la Rubisco. L'équation (1.11) peut ainsi être réécrite :

$$A_n = V_c \cdot (1 - 0.5/S * O/C) - R_d \quad (1.13)$$

En l'absence de la respiration autre que photorespiratoire ($R_d=0$), et lorsque la densité de flux nette de CO_2 est nulle ($A_n=0$), Γ prend la valeur de 2. La concentration en CO_2 dans ces conditions est notée Γ^* (Brooks et Farquhar, 1985, Laisk, 1977). En remplaçant Γ par sa valeur, l'équation (1.12) permet d'exprimer Γ^* en fonction de S :

$$\Gamma^* = 0,5 * O / S \quad (1.14)$$

Les équations (1.13) et (1.14) nous permettent ensuite d'écrire :

$$A_n = (1 - \Gamma^*/C) \cdot V_c - R_d \quad (1.15)$$

D'après le modèle adopté par Farquhar et Von Caemmerer, 1982 et présenté dans la figure 1.13, l'activité biochimique globale des deux cycles peut être limitée par la disponibilité en RubP lorsque sa régénération n'est pas assez rapide. Dans le cas contraire, lorsque le RubP est saturant, on considèrera que l'activité des cycles est limitée par les propriétés cinétiques de la Rubisco.

1.4.2.2 : Assimilation à RubP saturant

Lorsque le RubP est saturant, V_c est dépendant des propriétés enzymatiques de la Rubisco. Le CO_2 et l' O_2 étant respectivement des inhibiteurs compétitifs des activités oxygénase et carboxylase de la Rubisco, il est possible d'expliciter V_c selon un formalisme de type "Michaelis-Menten" (activité d'une enzyme en présence d'un inhibiteur compétitif) :

$$V_c = \frac{V_c^{\max} \cdot C}{C + K_c \left(1 + \frac{O}{K_o}\right)} \quad (1.16)$$

En couplant les relations (1.15) et (1.16), l'assimilation à RubP saturant est donnée par la relation :

$$A_c = \frac{(C - \Gamma^*) \cdot V_c^{\max}}{C + K_c \left(1 + O / K_o\right)} - R_d \quad (1.17)$$

1.4.2.3 : Assimilation à RubP limitant

Lorsque le RubP est limitant, V_c dépend de la vitesse de sa régénération, laquelle dépend de la fourniture d'ATP et de NADPH par les réactions photochimiques (transfert d'électrons). Farquhar et Von Caemmerer, 1982 ont explicité les consommations de NADPH et d'ATP d'après la stoechiométrie décrite dans la figure 1.13 :

$$\text{Densité de flux de NADPH consommé} = (2 + 2 \Gamma) \cdot V_c \quad (1.18)$$

$$\text{Densité de flux d'ATP consommé} = (3 + 3,5 \Gamma) \cdot V_c \quad (1.19)$$

La production d'une mole de NADPH nécessite le transfert de deux moles d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Le rapport entre transfert d'électrons et production d'ATP reste incertain (voir Von Caemmerer, 2000). Farquhar et Von Caemmerer, 1982 ont ainsi choisi d'estimer la densité de flux d'électrons (J) nécessaire à l'activité des cycles sur la base de la consommation de NADPH, soit :

$$J = (4 + 4 \Gamma) \cdot V_c \quad (1.20)$$

En combinant les équations (1.12) et (1.14), il est possible d'exprimer Γ par sa relation en fonction de Γ^* , soit :

$$\Gamma = 2 \cdot \Gamma^* / C \quad (1.21)$$

En substituant l'équation (1.21) dans l'équation (1.20), il est possible de calculer V_c limité par le flux d'électron J d'après la relation :

$$V_c = \frac{J}{4 \frac{\Gamma}{C} + 2 \frac{\Gamma^*}{C}} \quad (1.22)$$

En couplant les relations (1.15) et (1.20), l'assimilation à RubP limitant est donnée par la relation :

$$A_j = \frac{(C \Gamma \Gamma^*) \cdot J}{4(C + 2 \Gamma^*)} \Gamma R_d \quad (1.23)$$

1.4.2.4 : Estimation du flux d'électrons en fonction de l'éclairement

La relation entre flux d'électrons et éclairage est très mal décrite. Le flux d'électrons pour un éclairage donné (J) est le plus souvent décrit empiriquement à l'aide d'une relation hyperbolique non équilatère :

$$\frac{J^2}{I} = J(I + J^{\max}) + I \cdot J^{\max} = 0 \quad (1.24)$$

ou J^{\max} est le flux maximal d'électron, I est l'éclairage intercepté, et $\frac{J^2}{I}$ est une constante empirique de courbure de la fonction.

1.4.2.5 : Limitation par la vitesse d'exportation des triose-phosphates

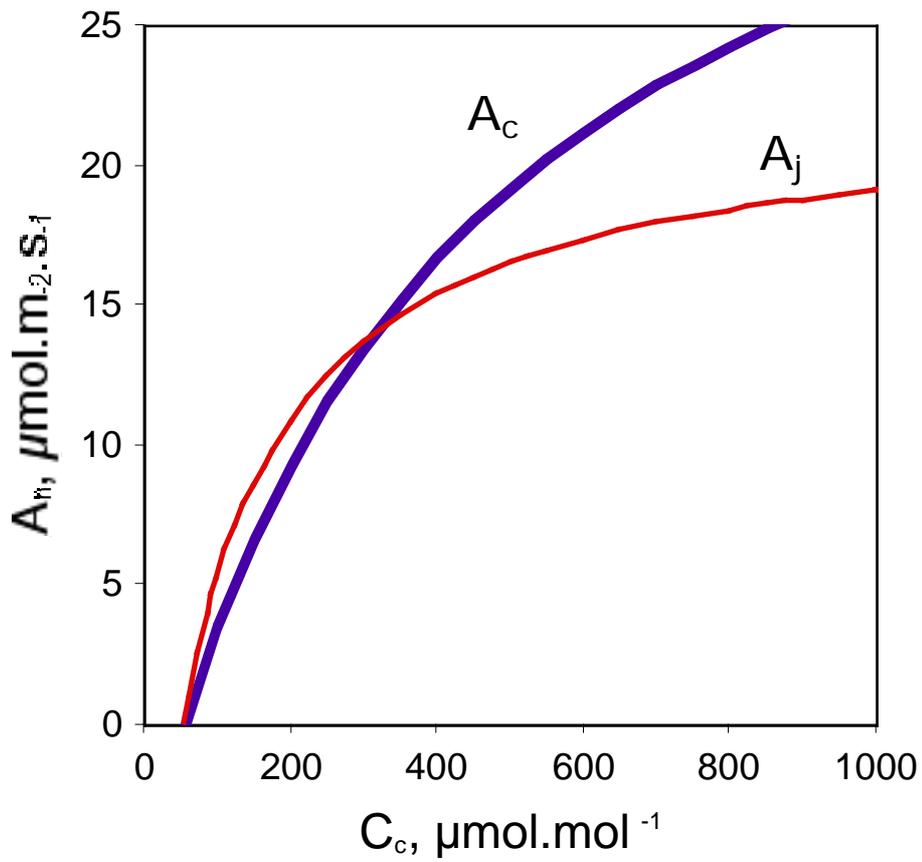
Lorsque C devient très élevée et l'éclairage saturant, l'assimilation nette de CO_2 peut être limitée par la vitesse d'exportation des triose-phosphates (TP) par le chloroplaste (voir Von Caemmerer, 2000 et Sharkey, 1985). Lorsque l'exportation de TP produits par le cycle de Calvin excède la capacité d'utilisation des TP pour la synthèse d'amidon et de glucose, la concentration en phosphate libre (Pi) décroît dans le chloroplaste car il se trouve fixé sous forme organique. La diminution de la concentration en Pi peut alors limiter l'activité photosynthétique. Le mécanisme supposé de cette limitation repose sur le fait que les phosphates deviennent alors limitants pour la synthèse d'ATP, et provoquent donc une diminution du ratio ATP/ADP.

L'assimilation nette devient dans ces conditions théoriquement insensible aux variations de fraction molaire de CO_2 et d' O_2 (Sharkey, 1985). Des observations montrant que la photosynthèse limitée par les TP est stimulée par l'oxygène et diminuée par un accroissement de la concentration en CO_2 ont suggéré l'existence d'une libération de Pi provenant du glycérate importé dans le chloroplaste par le cycle photorespiratoire (Harley et Sharkey, 1991).

Un modèle de limitation par les TP a été proposé (Harley, 1991 #45]), mais ne sera pas développé dans cette thèse. Cette limitation n'apparaît le plus souvent que lors de l'étude de plantes soumises à un enrichissement en CO_2 (Harley, *et al.*, 1992).

1.4.2.6 : Modélisation de l'assimilation nette en réponse au CO_2 ou à l'éclairage

Figure 1.14 : Courbe théorique de réponse de l'assimilation nette à C_c , modélisée par le modèle de Farquhar. L'assimilation nette est calculée comme le minimum des deux fonctions A_c et A_j .



Les réponses de l'assimilation au CO_2 et à l'éclairement, sont modélisées en prenant le minimum des deux fonctions A_c (1.17) et A_j (1.23) (ou des trois fonctions A_c , A_j et A_{tp} si la limitation liée aux triose-phosphates est prise en compte) , soit :

$$A_n = \min [A_c, A_j] \quad (1.25)$$

La figure 1.14 illustre une courbe théorique de réponse de A_n à C , et distingue l'assimilation à RubP saturant de l'assimilation à RubP limitant. D'après Farquhar et Von Caemmerer, 1982, la fraction molaire de CO_2 pour laquelle on observe la transition entre les deux limitations peut être calculée grâce à la relation :

$$C = \frac{K_c \left(1 + \frac{O}{K_o} \right) \frac{J^{\max}}{4 \cdot V_c^{\max}} + 2}{1 + \frac{J^{\max}}{4 \cdot V_c^{\max}}} \quad (1.26)$$

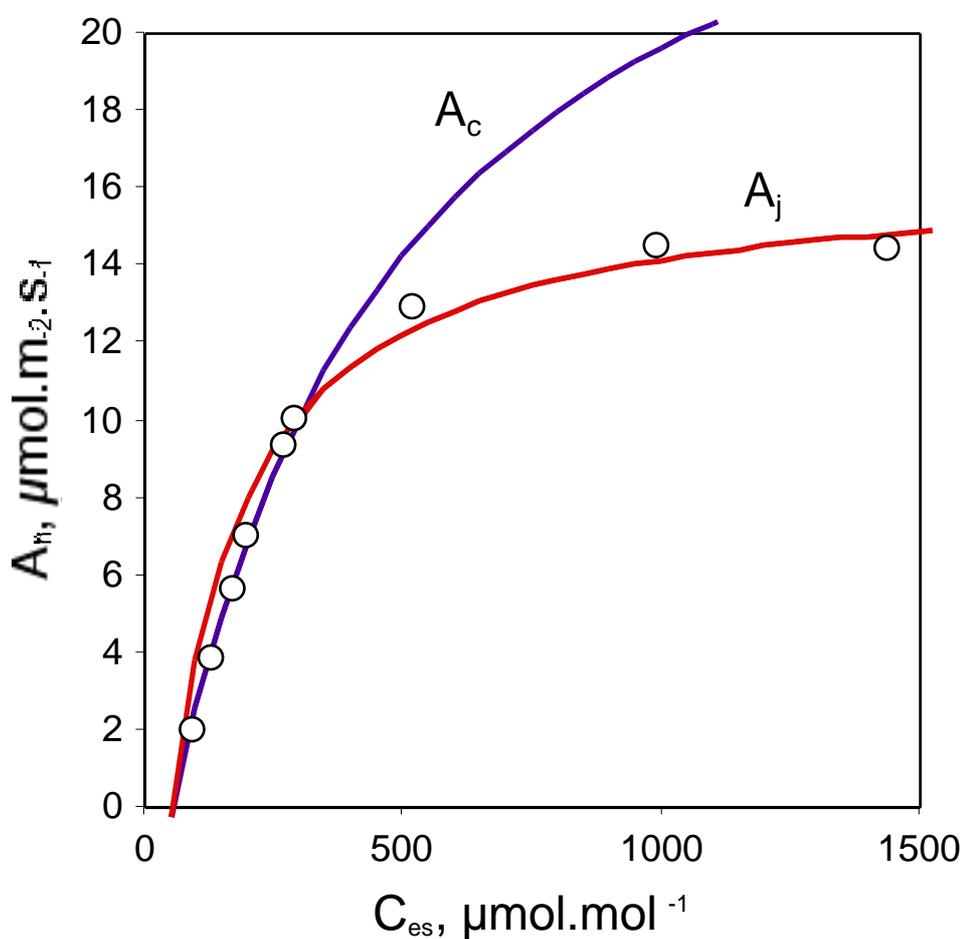
1.4.2.7 : Paramétrisation du modèle

La plupart des paramètres du modèle sont variables en fonction de la température foliaire. Toutefois, ces dépendances à la température ne seront pas abordées dans cette thèse. Sauf exception, toutes les expérimentations de cette thèse ont été réalisées pour une température foliaire de 25°C.

Constantes cinétiques de la Rubisco pour le CO_2 et l' O_2

K_c et K_o , sont les constantes cinétiques de Michaelis-Menten de la Rubisco respectivement pour les activités carboxylase et oxygenase. K_c a été très étudié (Yeoh, *et al.*, 1980, Yeoh, *et al.*, 1981), et présente une forte variabilité interspécifique. Toutefois, très peu d'études ont estimé à la fois K_c et K_o . Un tableau récapitulatif de ces paramètres estimés chez les plantes ayant un métabolisme de type C3 est disponible dans Von Caemmerer, 2000, et montre que K_c et K_o varient respectivement de 59 et 72 % selon les espèces. Ces paramètres sont le plus souvent estimés *in vitro*. Une seule étude a été réalisée *in vivo*, grâce à une approche originale utilisant les échanges gazeux sur du tabac transgénique ayant un contenu réduit en Rubisco (Von Caemmerer, *et al.*, 1994). Les K_c et K_o estimés *in vivo* lors de cette étude se sont avérés plus faibles que ceux estimés *in vitro* chez les plantes C3.

Figure 1.15 : Détermination de V_c^{\max} et J^{\max} à l'aide d'une courbe de réponse de A_n à C_{es} obtenue chez le noyer. Les données expérimentales sont représentées par des rond blancs. La fonction A_c est ajustée sur les données expérimentales à faible C_{es} (inférieures à $200 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), tandis que la fonction A_j est ajustée sur les données à fort C_{es} (supérieures à $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Dans ce cas précis, les résultats de l'ajustement ont été dans ce cas : $V_c^{\max} = 30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et $J^{\max} = 67 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **Il est important de noter que les paramètres V_c^{\max} et J^{\max} ainsi déterminés sont des paramètres apparents, les paramètres réels ne pouvant être déterminés que si la conductance interne est connue.**



La variabilité interspécifique de K_c et K_o est mal comprise. Elle peut résulter d'une faible variabilité de la structure de la Rubisco. Whitney, *et al.*, 1999 ont ainsi montré que la mutation d'un acide aminé proche du site actif sur la grande sous-unité de la Rubisco provoque une réduction de K_c et K_o .

Dans la majorité des travaux de modélisation, les paramètres K_c et K_o sont considérés constants chez les plantes C3, et un couple de valeurs est choisie parmi celles publiées.

Spécificité de la Rubisco

La spécificité de la Rubisco correspond au ratio entre les vitesses de carboxylation et d'oxygénation lorsque le CO_2 et l' O_2 sont à la même concentration aux sites actifs de l'enzyme. De la même manière que pour les constantes cinétiques de la Rubisco, la spécificité est considérée comme constante chez les espèces en C3 dans la plupart des travaux de modélisation. La variabilité de ce paramètre et les méthodes permettant de l'estimer *in vivo* seront discutées dans le chapitre II.

Vitesse maximale de carboxylation (V_c^{max}) et flux maximal d'électrons (J^{max})

V_c^{max} et J^{max} sont très variables selon les plantes et les conditions de culture, et doivent être systématiquement mesurés. V_c^{max} est considéré comme dépendant de la quantité de Rubisco active, et J^{max} de la quantité de protéines de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique comme le Cytochrome bf.

L'estimation de V_c^{max} est réalisée en ajustant la relation entre A_n et C_{es} réalisée à éclaircissement saturant à l'aide de la relation (1.17), dans la région de la courbe où le RubP est supposé saturant (en général pour des C_{es} inférieurs à $200 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, *cf.* figure 1.15). L'estimation de V_c^{max} est dépendante de la valeur choisie pour les constantes cinétiques K_c et K_o et la spécificité de la Rubisco.

J^{max} est quand à lui estimé en ajustant la relation entre A_n et C_{es} à éclaircissement saturant grâce à l'équation (1.23), dans la région de la courbe le RubP est supposé limitant, et où l'assimilation devient peu dépendante de la fraction molaire de CO_2 (C_{es} supérieurs à $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, *cf.* figure 1.15). Il existe également une méthode permettant de déterminer J^{max} à partir des courbes de réponse de l'assimilation à l'éclaircissement. Toutefois, cette méthode est imprécise, et ne sera pas détaillée ici.

Respiration à la lumière

Le modèle doit être paramétré avec R_d , *ie.* la respiration à la lumière liée au cycle de Krebs (respiration autre que celle associée à la photorespiration). La respiration mesurée à l'obscurité (R_{obs}) étant largement inhibée à la lumière (*cf.* I.2.2), R_{obs} ne peut donc pas être utilisée pour la paramétrisation du modèle. Il existe plusieurs méthodes pour estimer R_d , qui seront détaillées et discutées dans le chapitre II.

1.4.2.8 : Prise en compte de la conductance interne

Le modèle de Farquhar *et al.* est dans la quasi totalité des cas paramétré et utilisé sur la base de la fraction molaire de CO_2 aux sites évaporants intercellulaires (C_{es}), en négligeant donc la conductance interne (*ie* en postulant que $C_{es} = C_c$).

Fraction molaire de CO_2 aux sites enzymatiques de la Rubisco

La fraction molaire de CO_2 utilisée dans le modèle est celle dans le chloroplaste, au niveau des sites de carboxylation de la Rubisco. Farquhar *et al.* considèrent que le gradient de fraction molaire entre la cavité sous-stomatique (C_{es}) et les sites enzymatiques de carboxylation (C_c) est négligeable par rapport au gradient entre l'air ambiant (C_a) et la cavité sous-stomatique (C_{es}). Par conséquent, il a été considéré que C_{es} constitue une bonne approximation de C_c (Farquhar et Von Caemmerer, 1982). Des mesures fiables de C_c , qui n'ont été rendues possibles que plus tardivement (voir chapitre II), ont montré que cette approximation est fautive et que le gradient de fraction molaire $C_{es} - C_c$ ne peut pas être négligé.

Modification du modèle pour introduire la conductance interne

D'après le modèle de Gaastra (*cf.* I.3.1) le gradient entre C_{es} et C_c est lié à l'assimilation et la conductance interne d'après la relation :

$$C_{es} - C_c = A_n / g^i \quad , \text{ soit } C_{es} = A_n / g^i + C_c \quad (1.27)$$

En remplaçant C_{es} par son expression en fonction de C_c (1.27) dans l'équation (1.17), l'assimilation à RubP saturant peut être calculée d'après une équation du 2nd degré :

$$A_c^2 - A_c \left[g_i (C_i + K_c (1 + O/K_o)) + V_c^{\max} + R_d \right] + g_i \left[V_c^{\max} (C_i - \Gamma^*) - R_d (C_i + K_c (1 + O/K_o)) \right] = 0 \quad (1.28)$$

En combinant les équations (1.27) et (1.23), l'assimilation à RubP limitant peut être calculée d'après une nouvelle équation du 2nd degré :

$$A_c^2 - A_c \left[g_i (C_i + 2\Gamma^*) + J/4 + R_d \right] + g_i \left[(C_i + \Gamma^*) J/4 - R_d (C_i + 2\Gamma^*) \right] = 0 \quad (1.29)$$

Influence de la prise en compte de g^i sur la paramétrisation du modèle

V_c^{\max} est fortement sous estimée si g^i est faible (*ie* il existe un gradient entre C_{es} et C_c). En effet, dans ce dernier cas, le paramètre déterminé par les relations A_n vs C_{es} sera un paramètre apparent, inférieur au véritable V_c^{\max} , qui lui doit être estimé par l'ajustement de relations A_n vs C_c (Epron, *et al.*, 1995, Lloyd, *et al.*, 1992). Le V_c^{\max} apparent est un paramètre intégrant à la fois une composante métabolique et une composante diffusive. Par contre, l'estimation de J^{\max} est très peu dépendante de l'existence d'un gradient entre C_{es} et C_c , car ce paramètre est estimé à une fraction molaire de CO_2 saturante ($C_{es} > 500 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'influence de g^i sur l'estimation de V_c^{\max} et J^{\max} , et ses conséquences sur la modélisation, seront discutés dans le chapitre IV.

Il est également important de noter que la fraction molaire de transition entre assimilation à RubP saturant et limitant est plus faible si l'on prend en compte g^i . La transition estimée sur la base de C_{es} est donc une transition apparente. Si son estimation à l'aide de l'équation (1.26) est effectuée avec un V_c^{\max} apparent (*ie.* estimé à l'aide d'une relation A_n vs C_{es}), la fraction molaire déterminée sera une fraction molaire dans la cavité sous stomatique (C_{es}). Pour obtenir une fraction molaire aux sites de carboxylation, le calcul doit donc être effectué avec le V_c^{\max} réel (*ie* estimé à l'aide d'une relation A_n vs C_c).

Lien entre la conductance interne et la pente initiale de la relation A_n vs C_{es}

La "résistance mésophyllienne" du modèle de Chartier *et al.* (r^m) peut être explicitée de manière mécaniste d'après le modèle de Farquhar et Von Caemmerer, 1982. En effet la pente initiale de la relation A_n vs C_c peut être calculée d'après l'équation (1.27), soit :

$$\frac{dA}{dC_c} = \frac{V_c^{\max}}{\Gamma^* + K_c(1 + O/K_o)} \quad (1.30)$$

La pente initiale de la relation A_n vs C_{es} (correspondant à $1/r^m$) peut être calculée à partir de l'équation (1.9). Si l'on se place à $C_{es} = \Gamma^*$, Von Caemmerer et Evans, 1991 ont montré que la pente est donnée par la relation :

$$\frac{dA}{dC_{es}} = \frac{g^i \cdot V_c^{\max}}{g^i [\Gamma^* + K_c(1 + O/K_o)] + V_c^{\max} \Gamma_d} \quad (1.31)$$

Cette expression montre que la pente est dépendante de plusieurs facteurs : la conductance interne, V_c^{\max} , les constantes cinétiques de la Rubisco, la fraction molaire d'oxygène et R_d . D'après l'équation (1.31), le lien entre la "résistance mésophyllienne" r^m et la résistance interne purement diffusive du modèle de Gaastra (r^i) est donnée par la relation :

$$r^m = r^i + \frac{K_c}{(V_c^{\max} \Gamma_d)} + \frac{\Gamma^*}{\Gamma_d} + \frac{K_c}{K_o} \frac{O}{V_c^{\max} \Gamma_d} \quad (1.32)$$

Cette relation fait apparaître les deux composantes de r^m : la composante diffusive, et la composante biochimique, cette dernière variant avec V_c^{\max} , la respiration et la fraction molaire d'oxygène.

CHAPITRE II

Estimation de la conductance interne

II.1 □ Principales méthodes pour estimer la conductance interne

II.1.1 □ Introduction

Des méthodologies ont été développées depuis longtemps pour estimer la conductance stomatique, qui était le plus souvent identifiée comme le principal facteur limitant la disponibilité du CO₂ dans le chloroplaste. Les études expérimentales sur la diffusion du CO₂ dans le mésophylle ont tout d'abord consisté en la mesure d'une "résistance mésophyllienne", intégrant à la fois une composante diffusives et une composante biochimique (*cf.* modèle de Chartier *et al.*, chapitre I). Toutefois, ces approches ne sont pas satisfaisantes (*cf.* discussion du chapitre I), et ont été progressivement abandonnées au profit de méthodes permettant d'estimer une conductance interne purement diffusives, qui sont apparues à partir du milieu des années 1980 (Evans, *et al.*, 1986). Les trois principales méthodes permettant d'estimer la conductance interne seront détaillées dans ce chapitre. Toutes ces méthodes ayant comme point commun de requérir une estimation fiable de la fraction molaire de CO₂ aux niveau des sites évaporants intercellulaires de la cavité sous-stomatique (C_{es}), ce chapitre débutera par la présentation de la technique de mesure des échanges gazeux foliaires de CO₂ et de vapeur d'eau en système ouvert.

II.1.2 : Diffusion par la couche limite et les stomates

Grâce à l'utilisation d'une technique très utilisée de mesure des échanges gazeux foliaires de CO₂ et de vapeur d'eau en système ouvert, il est possible d'estimer les conductances de couche limite et stomatique à la vapeur d'eau et au CO₂, ainsi que la fraction molaire de CO₂ au niveau des sites évaporants intercellulaires de la cavité sous-stomatique (C_{es}). Une estimation fiable de ces paramètres est un préalable indispensable à toute détermination de la conductance interne.

On appellera "gaz vecteur" (noté x) le gaz ou le mélange gazeux contenant le CO₂ et la vapeur d'eau. Pendant cette thèse, quatre gaz vecteurs ont été utilisés □ l'air, l'azote, l'hélium et l'hélox (mélange hélium / oxygène dans les proportions 79/21).

II.1.2.1 : Conductances à la vapeur d'eau

La conductance de couche limite à la vapeur d'eau peut être soit déterminée grâce à la méthode du "bilan d'énergie" décrite dans l'annexe V, soit estimée en plaçant une surface transpirante (buvard humide) de surface connue dans la chambre (Field, *et al.*, 1989, Grace, 1989). Les chambres d'échange gazeux sont habituellement conçues de manière à ventiler énergiquement la feuille, de manière à maximiser la conductance de couche limite, et ainsi minimiser l'influence d'une erreur sur son estimation sur le calcul des autres conductances.

La conductance totale à la vapeur d'eau (g_{wx}^t) est calculée selon la relation proposée par Von Caemmerer et Farquhar, 1981, qui reste valable quelque soit le mélange gazeux utilisé (x) :

$$g_{wx}^t = \frac{E(1 - \bar{w})}{w_{es} - w_a} \quad (2.1)$$

avec E transpiration foliaire, w_{es} : fraction molaire de vapeur d'eau aux sites évaporants, et $\bar{w} = (w_{es} + w_a) / 2$. Pour estimer w_{es} , on considère que l'air au niveau des sites évaporants du mésophylle est saturé en vapeur d'eau. La fraction molaire de vapeur d'eau à la saturation (w_{sat}) est une fonction de la température. Ainsi, disposant d'une estimation de la température foliaire, w_{es} peut être calculé d'après la relation proposée par Buck, 1981 :

$$w_{es} = w_{sat} = \frac{0.61365 e^{\frac{17.502 \cdot T_f}{240.97 + T_f}}}{P_{atm}} \quad (2.2)$$

avec T_f température foliaire (en °C), et P_{atm} la pression atmosphérique (kPa). Cette dernière expression permet de calculer le gradient de pression partielle de vapeur d'eau entre les sites évaporant et l'air ambiant (VPD_l , leaf vapour pressure deficit) :

$$VPD_l = \frac{w_{es} - w_a}{P_{atm}} \quad (2.3)$$

Disposant d'une estimation de g_{wx}^b , et négligeant la conductance cuticulaire, la conductance stomatique à la vapeur d'eau peut être calculée selon la relation :

$$g_{wx}^s = \frac{1}{\frac{1}{g_{wx}^t} + \frac{k_f}{g_{wx}^b}} \quad (2.4)$$

avec g_{wx}^t : la conductance totale à la vapeur d'eau dans le mélange gazeux x, g_{wx}^b : la conductance de la couche limite à la vapeur d'eau dans le mélange gazeux x, k_f : un coefficient prenant en compte de la répartition des stomates sur les deux faces de la feuille (*cf.* Ball, 1987), soit :

$$k_f = \frac{Z^2 + 1}{(Z + 1)^2} \quad (2.5)$$

où Z est le rapport des conductances stomatiques d'une face de la feuille sur l'autre ($0 < Z < 1$), que l'on estime par le rapport des densités stomatiques entre les deux faces.

II.1.2.2 : Conductances au CO_2

La conductance de la couche limite au CO_2 est estimée à partir de celle pour la vapeur d'eau, selon la relation :

$$g_{cx}^b = g_{wx}^b \frac{D_{cx}}{D_{wx}} \quad (2.6)$$

avec g_{wx}^b : la conductance de la couche limite à la vapeur d'eau dans le mélange gazeux x , D_{cx} / D_{wx} : le rapport des diffusivités du CO_2 et de la vapeur d'eau dans le mélange gazeux x (cf. tableau 3.1, du chapitre III).

La conductance stomatique au CO_2 est calculée à partir de celle pour la vapeur d'eau en supposant que le CO_2 et la vapeur d'eau ont un trajet de diffusion identique (mais en sens inverse), entre les sites évaporant et l'air environnant la feuille. Connaissant le rapport des diffusivités du CO_2 et de la vapeur d'eau dans le mélange gazeux vecteur x (tableau 3.1, du chapitre III) on peut écrire :

$$g_{cx}^s = g_{wx}^s \cdot \frac{D_{cx}}{D_{wx}} \quad (2.7)$$

avec g_{cx}^s : la conductance stomatique du CO_2 dans le mélange gazeux x , g_{wx}^s : la conductance stomatique à la vapeur d'eau dans le mélange gazeux x , D_{cx} / D_{wx} : le rapport des diffusivités du CO_2 et de la vapeur d'eau dans le mélange gazeux (cf. tableau 3.1, du chapitre III).

Connaissant la conductance de la couche limite à la diffusion du CO_2 dans le mélange gazeux x , g_{wx}^b , et négligeant la conductance cuticulaire au CO_2 , on peut alors calculer la conductance totale au CO_2 , g_{cx}^t , selon la relation :

$$g_{cx}^t = \frac{1}{g_{cx}^s} + \frac{k_f}{g_{cx}^b} \quad (2.8)$$

II.1.2.3 : Fraction molaire de CO_2 aux sites évaporants intercellulaires (C_{es})

C_{es} correspond à la fraction molaire de CO_2 estimée au niveau des sites évaporants des espaces intercellulaires. Ce paramètre ne peut pas être mesuré d'une manière directe, mais peut être estimé grâce à la mesure des échanges de vapeur d'eau et de CO_2 . En considérant les interactions entre les gaz composant le système gaz vecteur / CO_2 / H_2O , Jarman, 1974 décrit le gradient de CO_2 atmosphère / sites évaporants suivant la relation :

$$C_a - C_{es} = \frac{\bar{x}}{g_{cx}^t} + \frac{\bar{w}}{g_{wc}^t} \cdot A_n + \frac{\bar{c}}{g_{cw}^t} \cdot E \quad (2.9)$$

g_{wc}^t : la conductance totale du CO_2 dans la vapeur d'eau, et

$\bar{c} = (C_{es} + C_a)/2$, $\bar{w} = (w_{es} + w_a)/2$, $\bar{x} = (x_{es} + x_a)/2$, x étant la fraction molaire du mélange gazeux vecteur.

Dans leur publication, Von Caemmerer et Farquhar, 1981 simplifient cette relation en prenant comme approximation $g_{ca}^t = g_{cw}^t$, car dans l'air et dans l'azote : $D_{ca} = D_{cw}$ (cf. tableau 3.1, du chapitre III), d'où

$$A_n = g_{cx}^t (C_a - C_{es}) - \bar{c} E$$

$$\text{soit } C_{es} = \frac{\frac{g_{cx}^t}{2} \cdot C_a - A_n}{g_{cx}^t + \frac{E}{2}} \quad \text{avec } x = \text{air ou } N_2 \quad (2.10)$$

II.1.2.4 : Situations où la conductance stomatique n'est pas uniformément répartie sur la surface foliaire

Une feuille soumise à un stress hydrique, à l'application d'ABA (acide abscissique), ou à une faible humidité peut présenter une répartition spatiale hétérogène de la conductance stomatique (Daley, *et al.*, 1989, Downton, *et al.*, 1988a, Downton, *et al.*, 1988b, Meyer et Genty, 1998, Mott, 1995, Mott, *et al.*, 1993, Terashima, *et al.*, 1988). Dans ce cas l'estimation de C_{es} est faussée, et les courbes de réponse de A_n à C_{es} ne peuvent plus être correctement interprétées et analysées (Downton, *et al.*, 1988a, Downton, *et al.*, 1988b, Meyer et Genty, 1998, Mott, 1995, Terashima, *et al.*, 1988). Une technique d'imagerie de fluorescence chlorophyllienne a été utilisée pendant cette thèse (cf. annexe I, ainsi que Genty et Meyer, 1994), pour s'assurer que la photosynthèse foliaire est bien uniforme.

II.1.3 : Discrimination isotopique du $^{13}CO_2$

La première technique permettant de quantifier la conductance interne a été proposée par Evans, *et al.*, 1986, et est basée sur la discrimination isotopique du $^{13}\text{CO}_2$ pendant la photosynthèse foliaire.

Il existe deux isotopes (atomes ayant un même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons) stables du carbone : ^{12}C et ^{13}C . L'isotope le plus abondant dans le CO_2 atmosphérique est le ^{12}C (environ 98,9%) et le moins abondant le ^{13}C (environ 1,1%). Les propriétés physiques (diffusion, dissolution) et biochimiques de ces deux isotopes sont différentes à cause de leur différence de masse. Le $^{12}\text{CO}_2$ va ainsi diffuser plus facilement que le $^{13}\text{CO}_2$ (la diffusivité du $^{12}\text{CO}_2$ est plus faible) entre l'atmosphère et les sites enzymatiques de la Rubisco. Ensuite, le $^{12}\text{CO}_2$ sera préférentiellement fixé par la Rubisco. Il en résulte un enrichissement de l'atmosphère environnant la feuille en $^{13}\text{CO}_2$. Plusieurs modèles ont été développés pour prédire cette discrimination foliaire des plantes C3 contre le $^{13}\text{CO}_2$ (voir Farquhar, *et al.*, 1989 pour une revue). Le plus utilisé est le modèle développé par Farquhar *et al.* (Farquhar, *et al.*, 1989, Farquhar, *et al.*, 1982, Farquhar et Richard, 1984), lequel prédit que la discrimination (Δ) est estimée par une relation complexe dépendant de la diffusion et des réactions biochimiques. Cette relation est décomposée en cinq termes décrivant chacun un processus influant sur la discrimination : (1) la diffusion à travers la couche limite, (2) la diffusion par le pore stomatique, (3) la diffusion des espaces gazeux intercellulaires jusqu'aux sites enzymatiques de la Rubisco, (4) la fixation par la Rubisco et (5) la photorespiration et la respiration liée au cycle de Krebs. Connaissant les pressions partielles de CO_2 de l'air (p_a), à la surface de la feuille (p_s), au niveau des sites évaporants intercellulaires (p_{es}), et aux sites de la Rubisco dans le chloroplaste (p_c), il est possible d'exprimer la discrimination foliaire grâce à la relation :

$$\Delta = a_b \frac{p_a - p_s}{p_a} + a \frac{p_s - p_{es}}{p_a} + a_i \frac{p_{es} - p_c}{p_a} + b \frac{p_c}{p_a} \left[\frac{eR_d/k + f\Delta^*}{p_a} \right] \quad (2.11)$$

ou a_b est le fractionnement par la couche limite (2,9‰), a le fractionnement par les stomates (4,4‰), a_i le fractionnement lors de la dissolution et de la diffusion en phase liquide (1,8‰), b le fractionnement pendant la carboxylation par la Rubisco et la PEP carboxylase (environ 27‰). Le dernier terme décrit la discrimination lors de la respiration, où e et f sont les fractionnements liés respectivement à la respiration "non photorespiratoire" et à la photorespiration, et k l'efficacité de carboxylation (voir Farquhar et Von Caemmerer, 1982). Les valeurs de e et f sont incertaines : e est compris entre 0 et 8‰, (O'Leary, 1981; Lin &

Ehleringer, 1997 □ Duranceau, *et al.*, 1999 □ Ghashghaie, *et al.*, 2001) et est variable selon les espèces et les conditions environnementales (Ghashghaie, *et al.*, 2001). Quant à f , sa valeur serait d'environ 8‰ (cf. Evans et Loreto, 2000, et références citées). Ce modèle complexe est généralement simplifié en négligeant les fractionnements par la couche limite, dans le mésophylle jusqu'à la Rubisco, et par la (photo)respiration, ainsi qu'en considérant qu'il n'y a pas de gradient de pression partielle de CO₂ dans le mésophylle ($p_{es}=p_c$, soit $g_i=+\infty$) On obtient ainsi :

$$\Delta_i = a \frac{p_a - p_{es}}{p_a} + b \frac{p_{es}}{p_a} = a + (b - a) \frac{p_{es}}{p_a} \quad (2.12)$$

Evans *et al.* (Evans, *et al.*, 1986) ont proposé une méthode permettant d'estimer la conductance interne basée sur le fait qu'en négligeant la diffusion par la couche limite, l'écart observé entre Δ mesuré (considéré comme égal au Δ donné par l'équation 2.11) et Δ_i (équation 2.12) est dû à la diffusion dans le mésophylle et à la (photo)respiration, soit :

$$\Delta - \Delta_i = (b - a_i) \frac{p_i - p_c}{p_a} + \frac{eR_d/k + f\Delta^*}{p_a} \quad (2.13)$$

La conductance interne étant donnée par la relation suivante : $g^i = (A_n \cdot P) / (p_{es} - p_c)$, ou P est la pression atmosphérique totale, il est possible d'exprimer l'équation (2.13) en fonction de g^i :

$$\Delta - \Delta_i = (b - a_i) \frac{A_n}{\frac{g_i}{P} p_a} + \frac{eR_d/k + f\Delta^*}{p_a} \quad (2.14)$$

La discrimination Δ est estimée en mesurant par spectrométrie de masse isotopique la teneur isotopique du CO₂ piégé en sortie d'un système d'échanges gazeux foliaire similaire au système d'échanges gazeux décrit dans l'annexe I (voir Evans, *et al.*, 1986 pour une description détaillée de la méthode). Δ , p_a et p_{es} sont ainsi mesurés pour une feuille donnée sous diverses conditions d'éclairage, en gardant p_a constant. La conductance interne est estimée par la pente de la relation $\Delta - \Delta_i$ vs. A_n , laquelle est donnée par la relation :

$$\text{pente} = [(b - a_i) \cdot P] / p_a \cdot 1/g^i \quad \text{avec} \quad [(b - a_i) \cdot P] / p_a = \text{cte}$$

Cette technique est fréquemment utilisée, mais présente l'inconvénient de requérir l'emploi d'un spectromètre de masse, qui est un équipement coûteux et relativement peu répandu. Cette technique est principalement restreinte à un travail de laboratoire. Il existe également des incertitudes sur les paramètres du modèle de Farquhar *et al.*, en particulier sur la valeur prise par b dont la variabilité interspécifique est très mal connue, ainsi que sur les valeurs prises par R_d et Δ^* .

II.1.4 Couplage des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne

Cette méthode a été développée plus tardivement que les méthodes précédentes, par Di Marco, *et al.*, 1990, Harley, *et al.*, 1992 et Loreto, *et al.*, 1992. Elle repose sur une mesure simultanée des échanges gazeux photosynthétiques foliaires et du rendement de fluorescence de la chlorophylle *a in vivo*, grâce à un dispositif tel que ceux décrits dans l'annexe I.

II.1.4.1 : Bases théoriques

D'après le modèle de Farquhar *et al.* (Farquhar et Von Caemmerer, 1982, Von Caemmerer, 2000), et en considérant l'existence d'un gradient $C_{es} - C_c$ dans le mésophylle, l'assimilation nette dans les conditions de limitation par la régénération du RubP (A_j) peut être calculée grâce à la relation suivante :

$$A_j = \frac{(C_c - \Gamma^*) \cdot J}{4(C_c + 2\Gamma^*)} - R_d \quad (\text{cf. chapitre I})$$

En réarrangeant cette relation et en substituant A_j par l'assimilation nette mesurée (A_n), on obtient :

$$J = (A_n + R_d) \frac{4(C_c + 2\Gamma^*)}{C_c - \Gamma^*} \quad (2.15)$$

Cette relation peut être appliquée aussi bien à RubP limitant que saturant (Harley, *et al.*, 1992). Sachant que C_c peut être exprimé d'après la relation : $C_c = C_{es} - A_n/g^i$ (cf. chapitre I), il est possible d'exprimer la relation (2.15) en fonction de C_{es} et g^i , d'où :

$$J = (A_n + R_d) \frac{4(C_{es} - A_n/g^i) + 8\Gamma^*}{C_{es} - A_n/g^i - \Gamma^*} \quad (2.16)$$

Enfin, il est possible d'exprimer g^i en réarrangeant la relation (2.16) :

$$g^i = \frac{A_n}{C_{es} - \frac{\Gamma^* [J + 8(A_n + R_d)]}{J - 4(A_n + R_d)}} \quad (2.17)$$

C_{es} , A_n et R_d peuvent être estimés par une mesure d'échanges gazeux photosynthétiques (cf. II-2), Γ^* est supposé être constant pour une espèce donnée (cf. II.2). Le flux d'électron (J) peut être estimé par une technique biophysique non invasive reposant sur des estimations du rendement de fluorescence de la chlorophylle *a in vivo* (cf. sections suivantes).

II.1.4.2 : Estimation du rendement quantique du photosystème II (Φ_{PSII})

La majorité de la fluorescence foliaire provient des molécules de chlorophylle *a* associées aux antennes collectrices du photosystème II (fluorescence dans le rouge, $\lambda=685\text{nm}$ environ, Bolhàr-Nordenkampf et Öquist, 1993). L'émission de fluorescence chlorophyllienne est un mécanisme de dissipation d'énergie compétitif avec la dissipation thermique, et la dissipation photochimique par émission d'un électron depuis le centre réactionnel du PSII. Le rendement de l'émission de fluorescence (Φ_F) peut être exprimé comme le rapport de la vitesse de désactivation par fluorescence sur la somme des constantes de vitesse de toutes les voies de désactivation, soit :

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_p + k_D} \quad \text{avec } k_f = \text{cte} \quad (2.18)$$

avec k_F , k_p et k_d étant les constantes de vitesse de dissipation respectivement par fluorescence, photochimie et thermique. Le rendement quantique de fluorescence chlorophyllienne est variable en fonction de la capacité du centre réactionnel du PSII à accepter une excitation en provenance de l'antenne (défini comme l'"ouverture" du centre). On définira dans cette thèse quatre rendements de fluorescence : le rendement minimal de fluorescence (Φ_{F_0}) lorsque tous les centres sont ouverts, le rendement maximal de fluorescence (Φ_{F_m}) lorsque tous les centres sont fermés, le rendement maximal de fluorescence lorsque la feuille est adaptée à la lumière (Φ_{F_s}), et le rendement de fluorescence à l'état "stationnaire" de la photosynthèse lorsque la feuille est adaptée à la lumière (Φ_{F_s}).

Le rendement minimal de fluorescence (Φ_{F_0}) est observé lorsque la feuille reçoit un éclairage de très faible intensité permettant aux centres réactionnels du PSII de rester ouvert, k_p étant maximal et k_d minimal, soit

$$\Phi_{F_0} = k_f / (k_f + k_p + k_d) \quad (2.19)$$

Le rendement maximal Φ_{F_m} est atteint lorsque la feuille adaptée à l'obscurité (tout les centres sont "ouverts") est soumise à un bref éclairage de forte intensité. Dans ce cas, le flash lumineux provoque la fermeture de tous les centres réactionnels du PSII, et la dissipation par la voie photochimique devient nulle ($k_p=0$), d'où :

$$\Phi_{F_m} = k_f / (k_f + k_d) \quad (2.20)$$

Le flash lumineux doit être suffisamment court pour que k_d ne soit pas modifié.

Lorsque la photosynthèse est active et que la feuille est adaptée à la lumière, seule une partie des centres réactionnels du PSII sont ouverts. Le rendement de fluorescence observé

dans ces conditions (Φ_{Fs}) sera donc intermédiaire entre Φ_{Fo} et Φ_{Fm} . Lors de l'exposition à un flash lumineux, le rendement de fluorescence maximal (Φ_{Fm}) sera dans ce cas intermédiaire entre Φ_{Fs} et Φ_{Fm} .

Genty *et al.* (Genty, *et al.*, 1989, Genty, *et al.*, 1992) ont montré que le rendement quantique du photosystème II (Φ_{PSII}), *i.e.* le rapport entre le flux d'électron circulant par le PSII et l'éclairement absorbé, peut être estimé grâce à la relation :

$$\Phi_{PSII} = \frac{\Phi_{Fm'} \Phi_{Fs}}{\Phi_{Fm'}} \quad (2.21)$$

Les rendements relatifs de fluorescence Φ_{Fo} , Φ_{Fm} , $\Phi_{Fm'}$ et Φ_{Fs} peuvent être estimés *in vivo* grâce à une technique biophysique non invasive décrite dans l'annexe I.

II.1.4.3 : Relations entre flux d'électron et Φ_{PSII}

Estimation du flux d'électrons

Le flux d'électron photosynthétique (J) a été estimé de deux manières à partir de mesures du rendement quantique du PSII. Tout d'abord, J peut être déduit d'un modèle simple. En considérant que le flux d'électron est proportionnel à l'éclairement intercepté par le PSII et le rendement quantique du PSII, il est possible d'écrire :

$$J = I \cdot a_f \cdot \Phi_{PSII} \quad (2.22)$$

avec I étant l'éclairement incident, a_f l'absorptance foliaire (généralement entre 0,8 et 0,9), b la fraction de l'éclairement absorbé atteignant le PSII (entre 0,45 et 0,5, voir Von Caemmerer, 2000).

L'autre méthode permettant d'estimer J consiste à calibrer Φ_{PSII} estimé par la fluorescence chlorophyllienne avec le rendement quantique du transfert d'électrons calculé par les échanges gazeux de CO_2 (Φ_e). En considérant qu'il faut 4 électrons pour un cycle de régénération du RubP suivant une carboxylation ou une oxygénation, il est possible d'exprimer le flux d'électrons de la manière suivante :

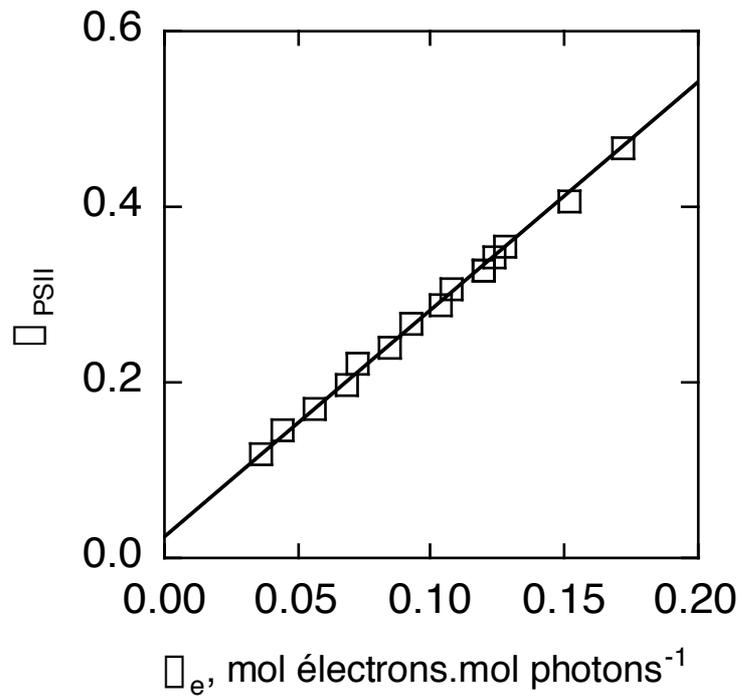
$$J = 4 V_c + 4 V_o \quad (2.23)$$

D'après le modèle de Farquhar *et al.* (*cf.* chapitre I), l'assimilation peut être donnée par la relation :

$$A_n = V_c - 0,5 V_o - R_d \quad , \quad \text{d'où } A_n + R_d = V_c - 0,5 V_o \quad (2.24)$$

En combinant les équations (2.23) et (2.24), il est possible d'écrire :

Figure 2.1 Relation entre le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII} estimé par la fluorescence chlorophyllienne) et le rendement quantique du transfert d'électrons (Φ_e estimé par les échanges gazeux), réalisé en condition "non photorespiratoire" (fraction molaire d'O₂ inférieure à 1%) pour une feuille du peuplier hybride "peace".



$$J = 4 (A_n + R_d) - 6 V_o \quad (2.25)$$

En plaçant la feuille dans une atmosphère avec une très faible fraction molaire d'oxygène (<1%), l'activité du cycle photorespiratoire est supposée négligeable (soit $V_o=0$), d'où :

$$J = 4 (A_n + R_d) = 4 A_b \text{ avec } O < 1\% \quad (2.26)$$

A_b étant l'assimilation brute. Ainsi, en conditions non photorespiratoires, le flux d'électrons photosynthétique peut être déduit d'une mesure des échanges gazeux foliaire. Connaissant J et l'éclairement absorbé (I_{abs}), le rendement quantique du transport d'électron est donné par la relation suivante :

$$\square_e = \frac{J}{I_{abs}} = \frac{4A_b}{I_{abs}} \quad \text{avec } O < 1\% \quad (2.27)$$

Sachant que \square_{PSII} et \square_e sont linéairement corrélés, il est possible de calibrer \square_{PSII} mesuré par la fluorescence chlorophyllienne avec \square_e calculé par les échanges gazeux en conditions non photorespiratoires (Genty, *et al.*, 1989), d'où :

$$\square_e = a \square_{PSII} + b \quad (2.28)$$

Un exemple de cette calibration est présenté dans la figure 2.1. Une fois a et b déterminés, il est possible d'utiliser cette relation pour estimer \square_e grâce à une mesure de \square_{PSII} , quelque soit l'activité du cycle photorespiratoire. Ainsi, en couplant les équations (2.27) et (2.28), il est possible d'estimer le flux d'électron J d'après la relation

$$J = (a \cdot \square_{PSII} + b) \cdot I_{abs} \quad (2.29)$$

Problèmes posés par l'existence de voies alternatives d'utilisation du flux d'électrons

Ces approches pour estimer J supposent que tout le flux d'électrons est utilisé par la photosynthèse. Toutefois, des activités biochimiques autres que la fixation du CO_2 et la photorespiration peuvent également utiliser le flux d'électron ou le pouvoir réducteur généré par la chaîne photosynthétique. C'est le cas d'activités biochimiques telles que la réduction des nitrates, nitrites et sulfates, la synthèse d'acides aminés ou de lipides, ainsi que des mécanismes de détoxification (cf. Genty et Harbinson, 1996). Le flux d'électrons photosynthétique peut également être utilisé pour réduire directement l'oxygène de l'air par la réaction de Mehler (cf. chapitre I). Toutefois, très peu de données quantitatives sont disponibles sur les voies alternatives d'utilisation du flux d'électrons. Loreto, *et al.*, 1994, en inhibant chimiquement le flux d'électrons vers la carboxylation ont mis en évidence un flux d'électrons résiduel (interprété comme le flux alternatif), lequel ne représente qu'une part

négligeable du flux d'électrons total. Grâce à une approche par modélisation couplant échanges gazeux et fluorescence, Laisk et Loreto, 1996 ont quant à eux estimé à 25-30% la proportion du flux d'électrons utilisé par les voies alternatives.

Les données quantitatives disponibles sur les flux alternatifs reposent soit sur l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, créant donc des situations non physiologiques, soit sur des modèles mathématiques de la biochimie photosynthétique. En conclusion, en l'absence de données expérimentales claires, il est nécessaire de garder à l'esprit que le flux d'électrons estimé par la fluorescence peut être surestimé de 0 à 10% (Genty et Harbinson, 1996), et d'estimer l'erreur potentielle sur le calcul de la conductance interne (*cf.* paragraphes suivants).

Les données obtenues par la fluorescence sont elles compatibles avec celles obtenues par les échanges gazeux

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée sur la face adaxiale de la feuille, et il a été estimé à partir de modèles des propriétés optiques foliaires que le signal mesuré par le fluorimètre provient majoritairement des assises supérieures du mésophylle. Quant à eux, les échanges gazeux estiment des flux de CO₂ correspondant à des chloroplastes situés dans toutes les assises chlorophylliennes du mésophylle. Ces deux techniques s'adressent donc à des populations de chloroplastes pouvant fonctionner différemment, car (i) l'environnement lumineux n'est pas homogène dans le mésophylle, et (ii) il peut exister un gradient de fraction molaire de CO₂ dans les espaces intercellulaires. Ce problème peut être circonvenu en mesurant pour chaque feuille la relation entre \square_{PSII} et \square_e , laquelle ne doit théoriquement pas changer pour une feuille donnée au cours d'une expérimentation.

Par contre, la comparaison de données obtenues par les échanges gazeux et la fluorescence peut être problématique si l'on modifie en cours d'expérimentation le gradient de fraction molaire de CO₂ dans les espaces intercellulaires du mésophylle (*eg.* en utilisant des mélanges gazeux augmentant la diffusivité du CO₂, *cf.* chapitre III). Ce problème sera discuté dans le chapitre III.

II.1.4.4 : Estimation de g^i par la méthode "à flux d'électron constant" ("J constant")

Cette approche correspond à la "constant J method" décrite dans Harley, *et al.*, 1992. Une courbe de réponse de l'assimilation nette à C_{es} est décrite. Simultanément à cette mesure

Figure 2.2 : Exemple d'une estimation de g^i réalisée selon le protocole à "flux d'électrons constant" chez le noyer. Relations réalisées simultanément entre l'assimilation nette et la fraction molaire de CO_2 au sites évaporants (C_{es}) et entre le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et C_{es} . L'éclairement de mesure est suffisamment faible (entre $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pour que Φ_{PSII} ne varie pas dans la gamme de C_{es} choisie.

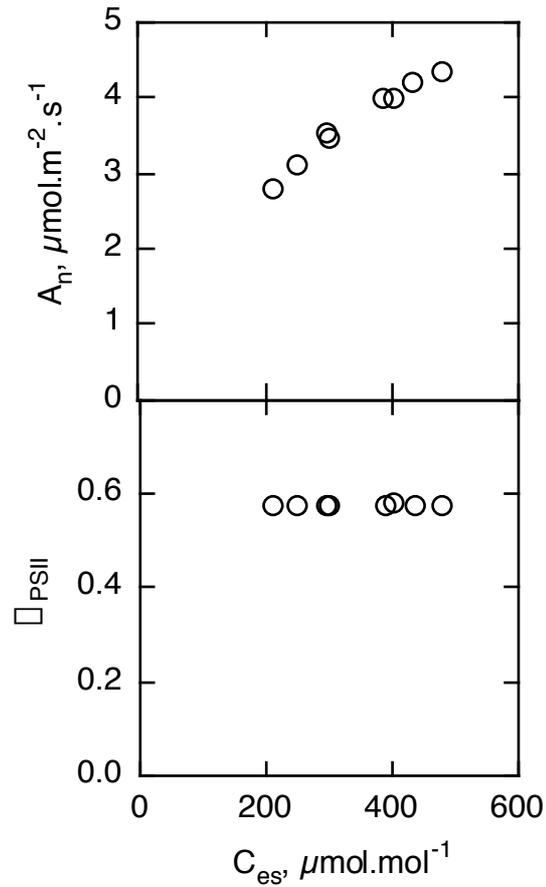
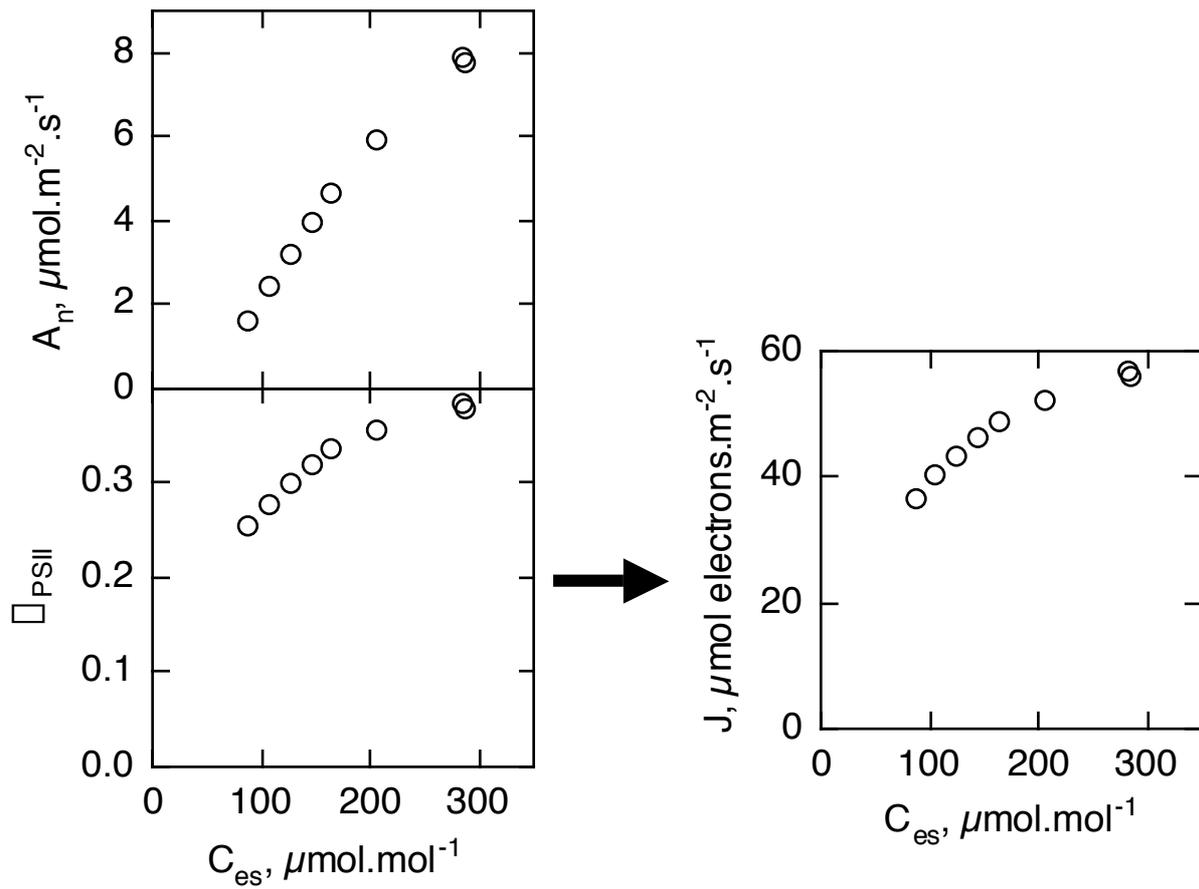


Figure 2.3 : Exemple d'une estimation de g^i réalisée selon le protocole à "Flux d'électrons variable". Relations réalisées simultanément entre l'assimilation nette et la fraction molaire de CO_2 au sites évaporants (C_{es}) et entre le rendement quantique du PSII et C_{es} . La relation entre le flux d'électrons (J) et C_{es} est ensuite calculée à partir de celle entre Φ_{PSII} et C_{es} .



d'échanges gazeux, \square_{PSII} est estimé grâce à une mesure de fluorescence chlorophyllienne. D'après le modèle de Farquhar *et al.*, il y a une région d'une courbe A_n vs C_{es} pour laquelle J est indépendant de la fraction molaire de CO_2 . La méthode à J constant consiste à choisir un éclaircissement suffisamment faible, pour que le flux d'électrons reste constant pour la gamme de C_{es} choisie. L'absence de variation de J est vérifiée par une absence de variation de \square_{PSII} (puisque d'après les équations (2.22) et (2.29), $J=\text{cte}$ si $\square_{\text{PSII}}=\text{cte}$). Un exemple de données est présenté dans la figure 2.2. La courbe A_n vs. C_{es} est ensuite ajustée (sur au moins 4 points) pour déterminer simultanément g^i et J grâce à l'équation (2.17). Il n'est donc pas nécessaire de déduire J de la mesure de \square_{PSII} .

II.1.4.5 : Estimation de g^i par la méthode "à flux d'électron variable" ("J variable")

Cette approche correspond à la "variable J method" décrite dans Harley, *et al.*, 1992. Une courbe de réponse de A_n à C_{es} est décrite à fort éclaircissement. Dans ce cas, J est variable en fonction de C_{es} , et il est donc nécessaire de quantifier J grâce à l'une des méthodes reposant sur la fluorescence chlorophyllienne décrites précédemment. Connaissant A_n , C_{es} et J , il est possible d'estimer g^i directement grâce à l'équation (2.17). Un exemple d'expérimentation est présenté dans la figure 2.3. Pour plus de précision, g^i peut également être estimé par ajustement sur l'ensemble d'une courbe de réponse de A_n et J en fonction de C_{es} .

II.1.4.6 : Sensibilité de la méthode

Une étude de sensibilité des méthodes couplant échanges gazeux et fluorescence à une erreur sur R_d , \square^* et au flux d'électrons a été réalisée par Harley, *et al.*, 1992. Ces auteurs montrent que dans tous les cas, plus la conductance interne est élevée, et plus une erreur sur les paramètres aura un effet sur l'estimation de g^i . Ainsi, en pratique, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées de manière fiable pour estimer de forts g^i (*i.e.* supérieurs à $0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Influence d'une erreur sur le flux d'électrons

La méthode à J variable requiert une estimation de J par la fluorescence chlorophyllienne, et surestimera donc g^i si des voies alternatives utilisent une part importante du flux d'électrons. Harley, *et al.*, 1992 ont estimé que pour des feuilles ayant un g^i inférieur à $0.2 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une surestimation de J de 5% induit une surestimation de g^i inférieure à environ 20%. Dans le cas

de la méthode à J constant, il n'est pas nécessaire d'estimer J par la fluorescence chlorophyllienne. Le flux d'électrons estimé simultanément avec g^i par cette approche correspond au flux d'électrons utilisé pour la photosynthèse, et est donc insensible à d'éventuelles voies alternatives.

Influence d'une erreur sur la respiration à la lumière

Les simulations de Harley, *et al.*, 1992 montrent que pour une feuille ayant un g^i de $0.2 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une erreur de $\pm 10\%$ sur R_d induira une erreur sur g^i d'environ 2% pour la méthode à J constant, et d'environ 5% pour la méthode à J variable. Une erreur modérée sur R_d a donc peu d'effet sur l'estimation de g^i par les deux méthodes. Toutefois, une estimation correcte de g^i ne peut pas être obtenue en utilisant R_{obs} à la place de R_d car R_d peut être jusqu'à 80% inférieur à la R_{obs} (*cf.* chapitre I). Il est donc indispensable d'estimer la respiration à la lumière avant toute estimation de g^i , grâce à l'une des méthodes décrite dans la section II.2.

*Influence d'une erreur sur \square^**

Les deux méthodes sont beaucoup plus sensibles à une erreur sur \square^* qu'à une erreur sur R_d . En effet, Harley, *et al.*, 1992 montrent que pour une feuille ayant un g^i de $0.2 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une erreur de $\pm 5\%$ sur \square^* induit une erreur de l'ordre de 15 à 25% sur g^i , quelque soit la méthode utilisée. Harley, *et al.*, 1992 considèrent que \square^* est très peu variable, quelque soit l'espèce. Toutefois, une revue récente d'Evans et Loreto, 2000 suggère que \square^* peut varier entre les espèces et les techniques utilisées (environ 30% d'écart entre les valeurs extrêmes). Par conséquent, il paraît nécessaire d'estimer \square^* pour chaque espèce préalablement à toute estimation de g^i .

En conclusion, la méthode à J constant est légèrement moins sensible à une erreur sur R_d et \square^* que la méthode à J variable, et présente l'avantage par rapport à cette dernière de ne pas être affectée par l'existence de voies alternatives d'utilisation du flux d'électrons. D'autre part, pour estimer g^i par la méthode à J variable, il est préférable de réaliser le calcul non pas sur un seul point (A_n , C_{es} , J), mais sur plusieurs points en ajustant des courbes de réponse A_n vs C_{es} et J vs C_{es} . Enfin, quelque soit l'approche choisie, il s'avère nécessaire d'estimer préalablement la respiration à la lumière et \square^* avant toute estimation de g^i .

II.1.5 : Marquage à ^{18}O

Cette méthode développée par Renou *et al.* (Renou, *et al.*, 1990), repose sur un couplage entre échanges gazeux foliaires, et spectrométrie de masse de l'¹⁸O. Elle permet d'estimer C_c , et donc potentiellement d'estimer g^i . Toutefois, le dispositif expérimental utilisé par Renou, *et al.*, 1990 (système d'échanges gazeux en circuit fermé couplé à un spectromètre de masse) ne permet pas d'estimer C_{es} simultanément à C_c , et cette méthode n'a par conséquent jamais été utilisée pour estimer g^i . Les bases théoriques de cette méthode, qui ne seront pas développées ici, sont les mêmes que pour la méthode de Harley *et al.*. Cette méthode par marquage à l'¹⁸O n'est que très rarement utilisée, car très peu de laboratoires maîtrisent ces techniques de marquages particulièrement lourdes et complexes.

II.1.6 Conclusion

Toutes les techniques permettant d'estimer g^i sont d'une utilisation complexe. En pratique, seule la technique reposant sur la discrimination du ¹³CO₂ et celle utilisant un couplage échange gazeux / fluorescence sont utilisées. La technique reposant sur la discrimination du ¹³CO₂ a comme principal inconvénient de nécessiter un accès à un spectromètre de masse isotopique (IRMS), qui est un appareil coûteux et relativement peu répandu. D'autre part, la collecte des échantillons gazeux et leur éventuel conditionnement sont des opérations délicates à réaliser et doivent être menées à bien avec beaucoup de soin. Ces contraintes font qu'en pratique, l'utilisation de cette technique est restreinte à un travail de laboratoire. En outre, il n'est pas envisageable d'estimer g^i à partir de teneurs isotopiques en ¹³C estimées sur des extraits de glucides solubles foliaires car l'estimation serait réalisée sur un seul point \square vs. P_{es}/p_a (il n'est pas possible de pooler plusieurs expérimentations étant donnée la variabilité entre feuilles de g^i).

La technique utilisant la discrimination du ¹³CO₂ a été comparée aux techniques couplant échanges gazeux et fluorescence par Loreto, *et al.*, 1992. Ces auteurs ont ainsi montré que ces méthodes fournissent des estimations de g^i très similaires. Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser les méthodes couplant échanges gazeux et fluorescence, qui sont plus simples et rapides à mettre en œuvre que les techniques isotopiques, et dont l'utilisation sur le terrain est envisageable. Leurs principaux inconvénients sont d'une part de ne pouvoir estimer g^i de manière fiable que si ce dernier est faible (*i.e.* inférieur à 0.3 mol.m⁻².s⁻¹), et d'autre part de requérir une estimation fiable de R_d , \square^* et J.

Toutes ces méthodes sont sensibles à une hétérogénéité de la photosynthèse (*cf.* II.1.2.4), étant donné qu'elle requièrent toutes une estimation de C_{es} par les échanges gazeux. Afin d'éviter toute situation hétérogène, une technique d'imagerie de la fluorescence chlorophyllienne sera utilisée (*cf.* annexe I).

II.2 □ Paramétrisation et mesures associées à l'estimation de g^i

II.2.1 □ Introduction

Harley, *et al.*, 1992 ont montré que l'approche couplant échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne choisie pour estimer la conductance interne est particulièrement sensible à la variabilité de deux paramètres (*cf.* II.1.4.6) □ la spécificité de la Rubisco (*cf.* chapitre I pour une définition) et la respiration (non photorespiratoire) à la lumière (*cf.* chapitre I). Ces paramètres sont également utilisés pour la paramétrisation du modèle de Farquhar *et al.* (Farquhar, *et al.*, 1980). La spécificité de la Rubisco est liée aux propriétés cinétiques intrinsèques de l'enzyme. La Rubisco étant très conservée chez les plantes C3, sa spécificité a souvent été supposée constante. Une étude des données publiées (*cf.* revue de Evans et Loreto, 2000), montre que la spécificité de la Rubisco est variable selon les espèces, et selon les techniques employées pour l'estimer.

D'autre part, les feuilles ont une activité respiratoire à la lumière, mais cette activité est plus faible qu'à l'obscurité (*cf.* chapitre I). La respiration est très variable selon les espèces et les conditions environnementales ou de culture, ce qui impose de l'estimer avant toute étude de la conductance interne.

La respiration à la lumière peut être estimée grâce à une technique reposant sur les échanges gazeux exposée dans la section suivante. Pour estimer la spécificité de la Rubisco, il existe deux ensembles de méthodes □ des méthodes *in vivo* reposant sur les échanges gazeux, et des techniques *in vitro*. L'emploi de techniques *in vitro* n'étant pas envisageables dans le cadre de cette thèse étant donné leur durée et la difficulté d'extraire de la Rubisco active, nous avons choisi de tester plusieurs approches *in vivo*.

II.2.2 □ Courbes de réponse de l'assimilation nette au CO_2 sous plusieurs éclairagements

Cette approche a été initialement proposée par Laisk, 1977 (article en Russe, *cf.* Brooks et Farquhar, 1985 ou Von Caemmerer, 2000 pour une description en anglais de la méthode), puis modifiée par Brooks et Farquhar, 1985 et Von Caemmerer, *et al.*, 1994. C'est la méthode *in vivo* la plus communément employée.

II.2.2.1 : Méthode de Brooks & Farquhar (1985)

Théorie

D'après le modèle de Farquhar *et al.* (*cf.* chapitre I), l'assimilation nette de CO₂ est donnée par la relation

$$A_n = \frac{V_c}{C_c} \Gamma^* - R_d$$

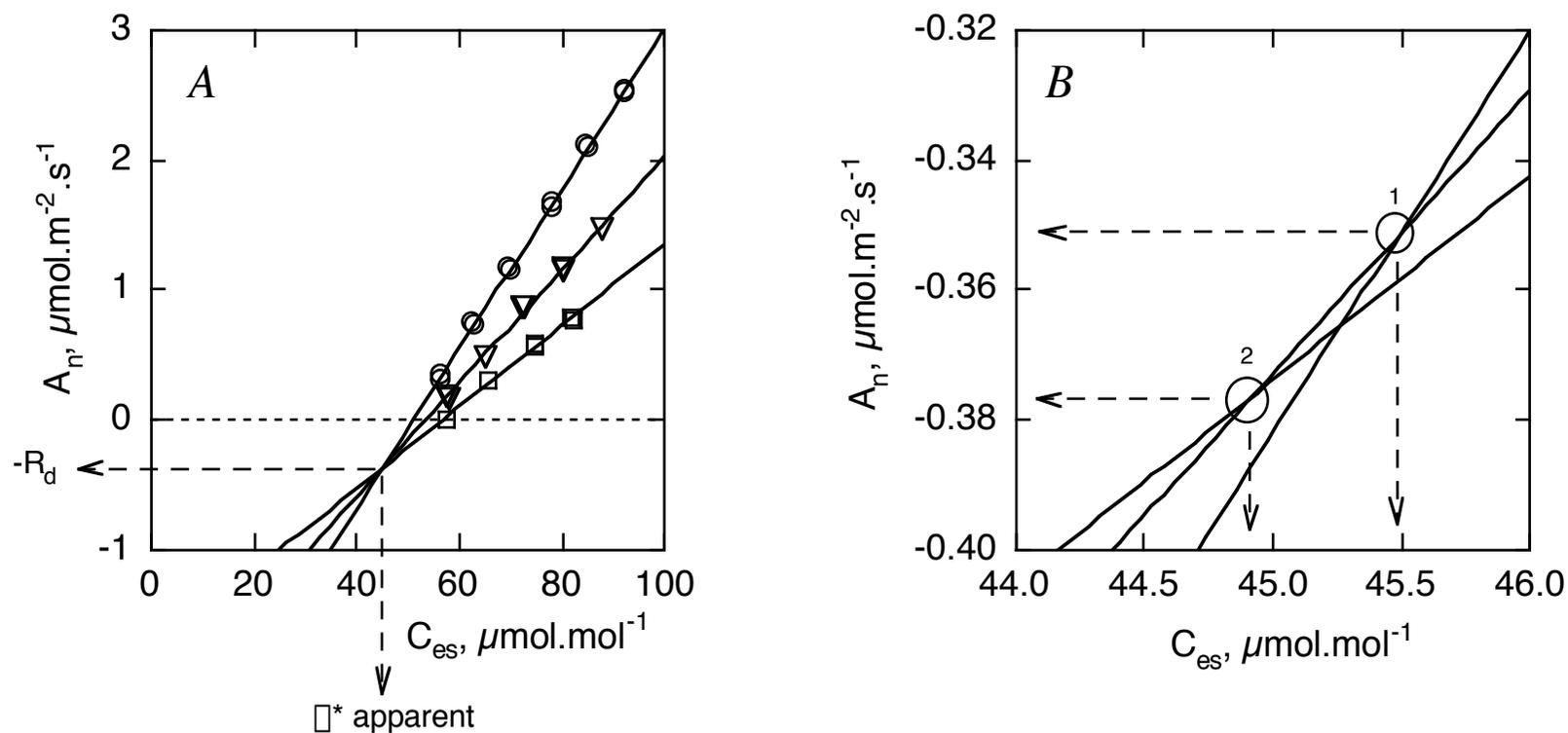
Γ^* est lié au facteur de spécificité de la Rubisco (*cf.* chapitre I) et est considéré constant quelles que soient les conditions d'éclairement. Laisk, 1977 pose également comme hypothèse que R_d est constant en variant l'éclairement (cette dernière hypothèse est inexacte, et sera discutée plus tard). Γ^* peut être défini comme la pression partielle de CO₂ pour laquelle A_n reste constante quelle que soit la valeur prise par V_c . Ainsi, grâce à l'équation précédente, on peut montrer que lorsque $C_c = \Gamma^*$, alors A_n prend la valeur $-R_d$. Pour estimer ce point, il est nécessaire de décrire des courbes de réponse de A_n à C_c , à faible C_c et à plusieurs éclairagements. A faible pression partielle de CO₂ (classiquement pour $C_c < 100 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), la relation A_n vs. C_c est linéaire, et l'intersection des droites donne le point où l'assimilation reste constante quel que soit la valeur prise par V_c . La figure 2.4A donne un exemple d'une telle expérimentation.

Toutefois, Laisk, 1977 et Brooks et Farquhar, 1985 considèrent qu'il n'existe pas de gradient de pression partielle de CO₂ dans le mésophylle (*i.e.* $g_i = +\infty$), et réalisent leurs expérimentations sur la base des relations A_n vs. C_{es} . Le point de compensation mesuré par cette approche est donc un Γ^* apparent (noté ici Γ^*_{app}).

Réponse de R_d à l'éclairement

Il a été montré que R_d diminue jusqu'à un plateau en augmentant l'éclairement (Atkin, *et al.*, 2000, Atkin, *et al.*, 1998, Brooks et Farquhar, 1985, Laisk et Loreto, 1996, Villar, *et al.*, 1994). Cette sensibilité de la respiration a une influence sur le point d'intersection des droites. Ainsi, comme l'illustre la figure 2.4B, il n'y a pas une intersection unique pour les trois

Figure 2.4 : Exemple d'une détermination de Γ^* selon le protocole de Brooks & Farquhar, 1985. Figure A : trois relations A_n vs. C_{es} sont effectuée sur la même feuille à trois éclaircissements différents : 90 (carrés), 160 (triangles) et 550 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ronds). Dans cette gamme de C_{es} , la relation est linéaire. Le Γ^* estimé par cette technique est un paramètre apparent (car déterminé sur la base de C_{es} , et non de C_c). Figure B : grossissement de la zone d'intersection des trois régressions, montrant que l'intercept n'est pas unique. Sont entourés en (1), l'intersection des droites correspondant aux deux plus forts éclaircissement, et en (2) aux deux plus faibles éclaircissements.



éclairagements. La respiration ainsi mesurée correspond à l'éclairagement intermédiaire aux deux éclairagements utilisés pour les deux pentes voisines.

Correction de Von Caemmerer et al. (1994)

A la différence de la méthode précédemment décrite, Von Caemmerer, *et al.*, 1994 prennent en compte la conductance interne, et effectuent leur calculs sur la base de C_c et non plus de C_{es} . Dans le cas d'une feuille ayant une conductance interne élevée (*e.g.* supérieure à $0,4 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), et ayant une respiration faible, \square_{app}^* peut être pris comme approximation de \square^* . Ainsi, pour beaucoup d'expérimentations utilisant la méthode de Laisk, 1977, et réalisées chez des herbacées à forte assimilation connues pour avoir une conductance interne élevée (*e.g.* le tabac, Evans et Loreto, 2000), \square_{app}^* constitue une bonne approximation de \square^* . Par contre, chez une plante ayant une conductance interne faible (*e.g.* beaucoup de ligneux), la valeur apparente sous estime \square^* , et doit donc être corrigée. Von Caemmerer, *et al.*, 1994 ont ainsi proposé une méthode permettant de calculer \square^* à partir de \square_{app}^* . Dans le chapitre I, on a vu que

$$A_n = \frac{C_{es} \square C_c}{g_i} \quad (2.30)$$

Par analogie, on peut postuler que la conductance interne s'applique au flux respiratoire de la même manière qu'aux flux d'assimilation. Il est alors possible d'écrire

$$R_d = \frac{\square^* \square \square_{app}^*}{g_i} \quad (2.31)$$

\square_{app}^* étant une concentration estimée au niveau des sites évaporants intercellulaires, et \square^* étant la concentration correspondante dans la mitochondrie (avec $\square^* > \square_{app}^*$). En réarrangeant cette équation, on peut écrire

$$\square^* = \square_{app}^* + \frac{R_d}{g_i} \quad (2.32)$$

Cette méthode impose d'estimer préalablement la conductance interne par une technique ne nécessitant pas de connaître \square^* avec précision (*e.g.* grâce à la discrimination du $^{13}\text{CO}_2$, Von Caemmerer, *et al.*, 1994).

II.2.2.3 : Approche choisie

Une approche originale dérivée de celle de Von Caemmerer, *et al.*, 1994 a été mise au point pendant cette thèse pour estimer simultanément g_i^i , \square^* et R_d , uniquement par couplage

échanges gazeux / fluorescence. Elle consiste tout d'abord à estimer Γ_{app}^* et R_d par la méthode de Brooks et Farquhar, 1985. D'après Harley, *et al.*, 1992, on a vu qu'il est possible d'estimer g^i d'après la relation

$$g^i = \frac{A_n}{C_i \left[\frac{\Gamma_{app}^* [J_T + 8(A_n + R_d)]}{J_T + 4(A_n + R_d)} \right]}$$

en couplant cette équation avec l'équation (2.32), on obtient

$$g^i = \frac{A_n + R_d N}{C_i \Gamma_{app}^* N} \text{ avec } N = \frac{J_T + 8(A_n + R_d)}{J_T + 4(A_n + R_d)} \quad (2.33)$$

Γ_{app}^* et R_d ayant été préalablement estimés, il est possible d'utiliser la relation (2.33) pour estimer g^i par ajustement d'une relation A_n vs. C_{es} , de manière analogue à celle décrite dans la section II.1.4.4. Puis, disposant d'une estimation de g^i , Γ_{app}^* et R_d , il ne reste plus qu'à calculer Γ^* à l'aide de l'équation (2.32).

II.2.2.4 : Conclusion

La technique de Brooks et Farquhar, 1985 est l'approche *in vivo* la plus utilisée, mais comme l'ont montré Von Caemmerer, *et al.*, 1994, ses estimations sont faussées chez les végétaux ayant une faible conductance interne. Ne disposant pas d'un accès à un spectromètre de masse, nous avons ainsi développé une approche originale dérivée de celle de Von Caemmerer, *et al.*, 1994.

Toutefois, toutes ces approches basées sur des courbes de réponse de A_n à C_{es} ou C_c sont délicates à utiliser car elles nécessitent de travailler à de faibles fractions molaires de CO_2 . D'une part, elle implique une précision de mesure qui est à la limite des possibilités d'un système d'échanges gazeux classique. D'autre part, travailler à faible fraction molaire de CO_2 signifie qu'il y aura un fort gradient de fraction molaire de CO_2 entre l'atmosphère ambiante (environ $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, voire beaucoup plus si l'on travaille dans une pièce mal aérée) et la chambre foliaire, ce qui induit une diffusion du CO_2 par les joints en mousse pinçant la feuille. Ce problème nous a conduit à concevoir des dispositifs permettant de minimiser ces problèmes de diffusion (*cf.* annexe III). En outre, la technique que nous avons choisie présente l'inconvénient d'être particulièrement longue (une expérimentation par jour).

II.2.3 Relation entre le point de compensation pour le CO_2 et la concentration

en oxygène

La lenteur et la complexité de l'approche présentée dans la section précédente nous ont conduit à tester une autre approche *in vivo* basée sur l'étude de la relation entre le point de compensation pour le CO₂ (Γ) et la concentration en oxygène.

II.2.3.1 : Méthode de Sumberg & Laisk (1995)

Γ^* et le point de compensation pour le CO₂ (Γ) sont tous deux linéairement dépendants de la concentration en oxygène Farquhar, *et al.*, 1980, Laing, *et al.*, 1974. La spécificité de la Rubisco peut être exprimée en fonction de Γ^* et de la concentration en oxygène (*cf.* équation 1.14) d'après la relation

$$S = \frac{O}{2\Gamma^*} \quad (2.34)$$

En posant comme hypothèse que la respiration à la lumière reste constante en variant la concentration en oxygène (O), alors la différence $\Gamma - \Gamma^*$ reste théoriquement constante quelle que soit O. Ainsi, Laisk et Sumberg, 1994 ont proposé que si cette proportionnalité entre Γ^* et Γ est respectée, l'équation (2.34) peut être réécrite en fonction de Γ , soit :

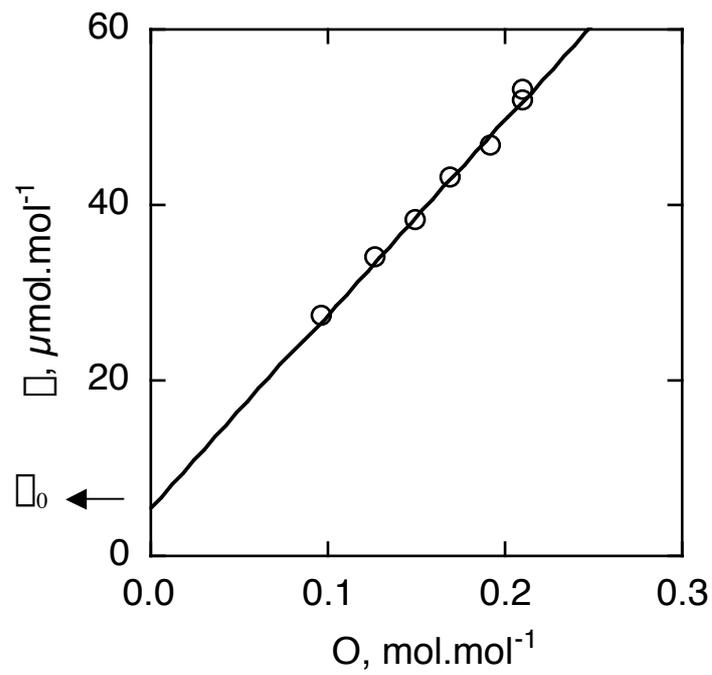
$$S = \frac{\Gamma O}{2\Gamma\Gamma} \quad (2.35)$$

Connaissant la pente de la relation Γ vs. O, il est ainsi possible de déterminer S. Sumberg et Laisk, 1995 proposent d'utiliser une gamme de concentration d'oxygène comprise entre 21 et 1%. Il est recommandé de se placer à fort éclairage pour obtenir la plus faible respiration possible, et par conséquent minimiser l'effet d'une éventuelle variation de R_d en fonction de O. Un exemple d'une telle expérimentation est présentée dans la figure 2.5.

II.2.3.2 : Approche choisie

A partir des travaux de Sumberg et Laisk, 1995, nous avons développé une approche originale pour estimer la spécificité de la Rubisco. Ainsi, d'après Farquhar, *et al.*, 1980, la relation entre Γ et O est beaucoup plus complexe que celle explicitée par Sumberg et Laisk, 1995. Les équations posées par Farquhar, *et al.*, 1980 permettent ainsi d'explicitier Γ d'après la relation suivante

Figure 2.5 : Exemple de détermination de la spécificité de la Rubisco d'après le protocole de Sumberg & Laisk, 1995. Chez une feuille de chêne vert, le point de compensation pour le CO₂ (Γ) a été déterminé sous plusieurs fractions molaires d'oxygène (O). Le point de compensation théorique pour lequel O=0 est noté Γ_0 .



$$\Gamma = \frac{\Gamma^* + K_c \frac{R_d}{V_c} + \frac{O}{K_o} \frac{R_d}{V_c}}{1 + \frac{R_d}{V_c}} \quad (2.36)$$

Cette relation peut être réarrangée en la couplant avec la relation (2.34)

$$\Gamma = \frac{0.5}{S} + \frac{K_c R_d}{K_o V_c^{\max}} \Gamma O + \frac{K_c \frac{R_d}{V_c}}{1 + \frac{R_d}{V_c}} \quad (2.37)$$

D'après cette équation, la pente de la relation Γ vs. O est donnée par

$$\frac{\Delta \Gamma}{\Delta O} = \frac{0.5}{S} + \frac{K_c R_d}{K_o V_c^{\max}} \quad (2.38)$$

et lorsque $O=0$, Γ prend la valeur

$$\Gamma_o = \frac{K_c \frac{R_d}{V_c}}{1 + \frac{R_d}{V_c}} \quad (2.39)$$

En couplant les équations (2.38) et (2.39) et (2.34), on obtient la relation suivante

$$\Gamma^* = O \cdot \frac{\frac{\Delta \Gamma}{\Delta O} - \Gamma_o}{\Gamma_o} \cdot \frac{K_c}{K_o} \cdot \frac{V_c}{K_c + V_c} \quad (2.40)$$

Ayant estimé la pente $\Delta \Gamma / \Delta O$ et l'intercept $\Gamma_{O=0}$, et disposant d'une estimation de K_c et K_o (cf. Von Caemmerer, 2000 pour une revue des valeurs des constantes cinétiques de la Rubisco), il est possible de déterminer S grâce à la relation (2.40). Toutefois, si des estimations de K_c sont disponibles pour une large gamme de végétaux (Yeoh, *et al.*, 1980, Yeoh, *et al.*, 1981), des estimations simultanées du couple K_c et K_o sont beaucoup plus rares, et n'ont été obtenues que pour quelques herbacées (Von Caemmerer, 2000).

Une autre formulation est possible, non plus en fonction de K_c et K_o , mais en fonction du ratio V_c^{\max} / V_o^{\max} et de K_c . En effet, d'après Laing, *et al.*, 1974, la spécificité de la Rubisco peut être exprimée d'après la relation suivante

$$S = \frac{K_o V_c^{\max}}{K_c V_o^{\max}} \quad (2.41)$$

Ainsi, en couplant les relations (2.40) et (2.41) et (2.34), on peut exprimer Γ^* d'après la relation

$$\Gamma^* = \frac{O_2 \cdot \Gamma^* \cdot \frac{K_o}{K_c + K_o}}{\frac{2 \cdot O_2 \cdot \Gamma^*}{\Gamma^*} + \frac{V_c^{\max}}{V_o^{\max}} \cdot \frac{K_o}{K_c + K_o}} \quad (2.42)$$

Cette relation présente l'avantage de ne plus requérir une estimation de K_o , mais nécessite de connaître le ratio V_c^{\max} / V_o^{\max} .

II.2.3.3 : Conclusion

Cette approche présente l'avantage d'être beaucoup plus facile à mettre en œuvre que celle reposant sur l'analyse des relations A_n vs C_{es} à plusieurs éclaircissements. Le dispositif expérimental est simple à concevoir, et une expérimentation ne prend que très peu de temps (3 à 4 expérimentations par jour). Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient d'être dépendante des valeurs données à K_c , K_o et/ou V_c^{\max}/V_o^{\max} , qui sont très peu documentées. Cet aspect sera discuté dans la section II.4.

II.2.4 Conclusion

Trois approches sont disponibles pour estimer la conductance interne. Pour ce travail, j'ai choisi d'utiliser l'approche reposant sur un couplage échanges gazeux / fluorescence, qui présente l'avantage d'être la plus simple à mettre en œuvre. Toutefois, ces méthodes, et en tout premier lieu celle choisie pour cette thèse, nécessitent de connaître la spécificité de la Rubisco (ou bien Γ^* , qui est directement dépendant de S) ainsi que la respiration à la lumière, lesquels sont susceptibles de varier selon les espèces et les conditions environnementales. D'autres part, toutes ces approches sont sensibles à une répartition hétérogène de l'ouverture des stomates, situation que l'emploi d'une technique d'imagerie de fluorescence nous permettra d'éviter.

II.3 Protocoles et paramétrisation

II.3.1 Protocoles pour estimer la conductance interne

Toutes les expérimentations de cette thèse ont été réalisées sur feuille détachée. Une feuille mature et non sénescence est détachée du rameau à l'aide d'une lame de rasoir neuve. Le pétiole est immédiatement placé dans un récipient d'eau distillée, puis recoupé une nouvelle fois dans l'eau. La feuille ainsi détachée est immédiatement placée dans la chambre d'échanges gazeux.

II.3.1.1 Méthode à flux d'électrons constant

Cette approche nécessite d'avoir préalablement déterminé le coefficient de spécificité de la Rubisco pour l'espèce étudiée ainsi que l'inhibition de la respiration obscure par la lumière (*cf.* II.1.4.4). La respiration à l'obscurité est estimée après avoir placé la feuille 30 à 40 min à l'obscurité et $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 dans la chambre d'échanges gazeux. Cette étape peut être également effectué à la fin de l'expérimentation. Sauf indications contraires, toutes les expérimentations ont été réalisées avec une température foliaire de 25°C . La feuille est ensuite illuminée avec un faible éclaircissement (classiquement entre 100 et $250 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Il est ensuite nécessaire d'attendre 1h30 minimum jusqu'à ce que A_n , C_{es} et g^s_c soient stationnaires. Le VPD foliaire est maintenu entre 1 et 1,3kPa pendant toute l'expérimentation. Une courbe de réponse de A_n à C_{es} et de \square_{PSII} à C_{es} est ensuite réalisée en partant de $C_a=350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, et en diminuant C_a par palier de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ jusqu'à 150 ou $100 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Un retour à $C_a=350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ est ensuite effectué. Seul les couples de points A_n/C_{es} ou \square_{PSII} reste constant (variations de \square_{PSII} inférieures à 1%) sont conservés. Un ajustement ("curve fitting") à l'aide du logiciel Sigma-Plot (Sigma-Plot 4.17, Jandel Scientific) est réalisé sur au moins 4 couples de points pour déterminer simultanément g^i et J à l'aide de l'équation (2.17). Un exemple d'expérimentation est présenté dans la figure 2.2.

II.3.1.2 Méthode à flux d'électrons variable

Comme pour la méthode à "J constant", cette approche nécessite d'avoir préalablement déterminé le \square^* de l'espèce étudiée et l'inhibition de la respiration obscure par la lumière. Les différences avec le protocole à "J constant" sont que l'on se place à fort éclaircissement (classiquement entre 450 et $1000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), et que l'estimation de \square_{PSII} est utilisée pour calculer J grâce à l'une des méthodes décrites dans la section II.1.4.3, laquelle sera précisée ultérieurement pour chaque expérimentation. Un ajustement à l'aide du logiciel

Sigma-Plot est réalisé sur au moins 4 points $A_n/C_{es}/J$ pour estimer g^i à l'aide de l'équation (2.17). Un exemple d'expérimentation est présenté dans la figure 2.3.

II.3.2.1 Protocoles pour estimer la spécificité de la Rubisco et la respiration à la lumière

II.3.2.1.1 Courbes de réponse de l'assimilation nette au CO_2 sous plusieurs éclairagements (technique dérivée de Brooks & Farquhar, 1985)

Les expérimentations ont été réalisées à l'aide du Li-6400 équipé d'une tête combinant échanges gazeux et fluorescence (Annexe I) et d'un système minimisant la diffusion du CO_2 (Annexe III). Le protocole pour estimer g^i à "J constant" est immédiatement suivi par trois courbes de réponse de A_n à C_{es} (avec $C_{es} < 100 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), chacune réalisées à un éclairage différent (classiquement 100, 250 et 600 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Les coordonnées du point d'intersection des droites 100 et 250 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nous donnent Γ^*_{app} et R_d (cf. figure 2.4). g^i et J sont alors ajustés simultanément à l'aide de Sigma-Plot avec l'équation (2.33). Puis, connaissant g^i , R_d et Γ^*_{app} , Γ^* est calculé à l'aide de l'équation (2.32).

II.3.2.2.1 Relation entre le point de compensation pour le CO_2 et la concentration en oxygène (technique dérivée de Sumberg, 1995)

Les expérimentations ont été réalisées sur feuille détachée à l'aide du Li-6400 et du système pour minimiser la diffusion du CO_2 décrit dans l'annexe III. Le CO_2 utilisé pour l'injection du Li-6400 est du CO_2 dilué dans le l'azote (15% CO_2). La variation de fraction molaire d' O_2 est obtenue soit en mélangeant O_2 et N_2 purs à l'aide de deux contrôleurs de débit, soit en diluant de l'air ambiant (ou de l'air comprimé) avec du N_2 à l'aide de deux contrôleurs de débit (cf. annexe I). La feuille est placée à fort éclairage (1000 à 1500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pendant 1h à 1h30. Puis le point de compensation pour le CO_2 est pour les fractions molaires d' O_2 suivantes \square 0.21/0.19/0.17/0.15/0.13/0.11/0.21 $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. La pente $\square\square/\square O$ est estimée, ainsi que \square_0 . La spécificité de la Rubisco est ensuite calculée à l'aide de l'équation (2.42). Un exemple d'expérimentation est présenté dans la figure 2.5.

II.4 □ Variabilité de la spécificité de la Rubisco et de la respiration à la lumière

II.4.1 □ Introduction

L'estimation de Γ^* et de R_d est nécessaire avant d'estimer la conductance interne chez une espèce donnée (cf. II.1.4). L'objectif de cette étude est de comparer les différentes approches détaillées dans la section II.2, afin choisir une méthode permettant d'estimer les Γ^* et R_d qui seront utilisés pour le calcul de g^i dans les chapitres III et IV. □ Nous documenterons la variabilité inter et intraspécifique de ces paramètres. Γ^* et R_d seront mesurés chez le peuplier hybride "Peace", le rosier, le laurier rose, le noyer, le chêne vert et le lamier. La variabilité intraspécifique sera étudiée en réponse à un traitement lumineux chez le noyer (feuille d'ombre et de lumière), et en fonction de l'âge des feuilles chez le chêne vert.

II.4.2 □ Matériel et méthodes

Les expérimentations ont toutes été réalisées sur feuille détachée (cf. protocole dans l'annexe I). Environ 20 peupliers hybrides "Peace" (*Populus koreana x trichocarpa* cv peace), 4 rosiers (*Rosa rubiginosa*), 4 lauriers rose (*Nerium oleander*), et 5 chênes verts (*Quercus Ilex*) ont été cultivés sous serre à Orsay. Des lamiers (*Lamium galeobdolon*) ont été cultivés dans des conditions d'ombre (inférieur à $100\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ratio rouge / rouge lointain = 0.17) dans une chambre climatisée à Orsay. Les conditions de culture à la faculté d'Orsay sont précisées dans le chapitre III. Pour le peuplier Peace, des feuilles matures ont été prélevées entre le 6^{ème} et le 9^{ème} rang en partant de l'apex. Neuf jeunes noyers de 3 ans ont été cultivés en extérieur à l'INRA de Clermont-Ferrand dans des conditions de cultures différents □ un traitement de témoin de lumière, un traitement de lumière avec un enrichissement en CO_2 ($700\mu\text{mol.mol}^{-1}$), et un traitement d'ombre (cf. Chapitre IV pour un descriptif des conditions de culture). Les plants de tabac W38 (*Nicotiana tabacum* cv W38) ont été cultivés au CEA-Cadarache soit dans une chambre climatisée ($T=21^\circ\text{C}$, éclairement d'environ $300\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), soit sous serre.

Le matériel et les protocoles permettant d'estimer Γ^* et R_d sont décrits dans l'annexe I.

Table 2.1 Résultats du protocole dérivé de Brooks & Farquhar (1985) pour le lamier, le peuplier hybride “Peace” et le rosier. Γ^* apparent (*ie.* non corrigé pour g^i) a été déterminé selon la méthode de Brooks & Farquhar (1985). Γ^* est donné pour une fraction molaire d’oxygène de 0.21 mol.mol⁻¹, et une température foliaire de 25°C. R_d a été déterminé dans les condition de mesure de g^i (*ie.* sous un faible éclaircissement, compris entre 100 et 150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les solubilités à 25°C du CO₂ (0.0334 mol.bar⁻¹) et de l’oxygène (0.00126 mol.bar⁻¹) on été utilisées pour calculer la spécificité de la Rubisco en phase liquide (S). La conductance interne n'est indiquée ici que pour information. Pour chaque colonne, les résultats avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$). Pour une espèce donnée, Γ^* apparent est significativement inférieur à Γ^* , et R_d significativement inférieur à R_{obs} (test de Student apairé, $\alpha=0.05$, résultats du test non présentés sur le tableau).

Espèce	Γ^* apparent μbar	R_d $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	R_{obs} $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Inhibition R_{obs} %	g^i $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Γ^* μbar	S	n
Lamier	39.2±1.5 ^a	0.31±0.07 ^a	0.53±0.12 ^a	39.4±17.2 ^a	0.097±0.041	43.1±2.4 ^a	93.5±5.3 ^a	4
Peuplier “peace”	46.9±0.6 ^b	0.30±0.07 ^a	0.91±0.10 ^b	66.0±11.7 ^a	0.152±0.031	48.9±0.4 ^b	81.4±0.9 ^b	3
Rosier	43.4±1.8 ^c	0.47±0.17 ^a	0.77±0.15 ^b	36.4±28.7 ^a	0.162±0.057	46.7±1.8 ^{bc}	85.0±3.3 ^{bc}	4
Laurier rose	37.7±3.0 ^a	0.78±0.40 ^a	1.33±0.00 ^c	41.4±29.8 ^a	0.108±0.017	45.6±2.0 ^{ca}	88.5±4.1 ^a	2

Tableau 2.2 Résultats du protocole dérivé de Brooks & Farquhar (1985) pour le noyer. Les trois traitements appliqués aux jeunes noyers sont détaillés dans le chapitre IV. Pour chaque colonne, les résultats avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$). Pour chaque traitement, Γ^* apparent est significativement inférieur à Γ^* , et R_d significativement inférieur à R_{obs} (test de Student apairé, $\alpha=0.05$, résultats du test non présentés sur le tableau).

Traitements	Γ^* apparent μbar	R_d $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	R_{obs} $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Inhibition R_{obs} %	g^i $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Γ^* μbar	S	n
Lumière	45.6±2.2 ^a	0.60±0.13 ^a	1.05±0.09 ^a	42.8±10.6 ^a	0.203±0.023 ^a	48.8±2.1 ^a	79.7±3.3 ^a	4
Ombre	49.2±2.4 ^a	0.31±0.04 ^b	0.51±0.15 ^b	37.2±12.7 ^a	0.110±0.026 ^b	52.4±2.0 ^a	74.3±3.0 ^a	3
Double CO ₂	47.5±4.7 ^a	0.63±0.09 ^a	0.98±0.25 ^a	31.4±27.7 ^a	0.198±0.044 ^a	50.9±3.9 ^a	76.4±5.8 ^a	3
moyennes	47.2±3.2			37.7±16.4		50.5±2.9	77.1±4.3	10

II.4.3 □ Résultats

II.4.3.1 : Courbes de réponse de A_n à C_{es} sous plusieurs éclairagements

Les résultats obtenus avec cette méthode sont présentés dans les tableaux 2.1 et 2.2. Les conductances internes utilisées pour corriger \square^* apparent sont indiquées ici pour information, et seront discutées dans le chapitre IV. La respiration à la lumière a été mesurée à faible éclairage (100 à 250 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, correspondant à l'éclairage de mesure de g^i par le protocole à "J constant") chez le Lamier, le Peuplier "Peace", le Rosier et le Laurier rose (tableau 2.1) et chez le Noyer (tableau 2.2) en réponse à trois traitements expérimentaux (feuilles de lumière, feuille d'ombre et traitement fort CO_2 , cf. chapitre IV). La respiration à la lumière est dans tous les cas significativement plus faible que la respiration à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition de R_{obs} par la lumière mesuré à faible éclairage varie de 31 à 66% selon les espèces, et n'est pas significativement affecté par les trois traitements chez le Noyer. \square^*_{app} est dans tous les cas significativement inférieur à \square^* corrigé pour la conductance interne. \square^* n'est pas affecté significativement par les trois traitements expérimentaux appliqués au Noyer.

II.4.3.2 : Relation entre le point de compensation pour le CO_2 et la concentration en oxygène

La méthode utilisée par Sumberg et Laisk, 1995 a été comparée à notre méthode corrigée, ainsi qu'à la méthode dérivée de Von Caemmerer, *et al.*, 1994 (tableaux 2.3 et 2.4). Chez le Tabac W38 (*Nicotiana tabacum* L. cv. W38), l'estimation de \square^* réalisée par Von Caemmerer, *et al.*, 1994 est très inférieure à la valeur obtenue en utilisant la méthode de Laisk et Sumberg, 1994, mais est très proche de l'estimation effectuée en corrigeant la méthode de Sumberg et Laisk, 1995 (équation 2.42). La situation est inversée chez le Peuplier "Peace" (tableau 2.3) et le Laurier rose (tableau 2.4) où l'estimation réalisée par la méthode dérivée de Von Caemmerer, *et al.*, 1994 est très proche de celle obtenue par la méthode de PROGCOMP ENRfu Laisk et Sumberg, 1994, mais est significativement plus élevée que l'estimation obtenue en corrigeant cette dernière méthode. Les résultats du Laurier rose (tableau 2.4) montrent également que la méthode de PROGCOMP ENRfu Laisk et Sumberg, 1994 corrigée est très sensible à K_c . La méthode de PROGCOMP ENRfu Sumberg et Laisk,

Tableau 2.3 Résultats de la méthode de Laisk & Sumberg (1995) non corrigée (équation 2.35) et corrigée (équation 2.42), chez le tabac W38 et le peuplier “Peace”. σ^* et S ont été déterminés selon trois méthodes, distinguées par des chiffres entre parenthèse : (1) méthode de Laisk & Sumberg (1994) non modifiée, (2) notre méthode dérivée de celle de Laisk & Sumberg 1994 (cf. équation 2.42), (3) notre méthode dérivée de Brooks & Farquhar, 1985 (cf. tableau 2.1). Les constantes cinétiques pour le CO₂ (K_c) utilisées pour le calcul sont 569 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le Peuplier (Yeoh *et al.*, 1981), et 247 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le Tabac W38 (Von Caemmerer *et al.*, 1994). Les données en italique sont tirées de Von Caemmerer *et al.*, 1994. Pour chaque colonne, les résultats avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$).

Espèce	S (1)	σ^* (1), μbar	σ_0 , μbar	S (2)	σ^* (2), μbar	n	σ^* (3), μbar	n
Tabac W38	84.4±1.5 ^a	45.9±0.9 ^a	5.3±0.7 ^a	100.3±3.1 ^a	38.7±1.2 ^a	3	38.6	
Peuplier “Peace”	83.5±0.7 ^a	47.9±0.4 ^a	3.4±0.6 ^b	87.8±0.2 ^b	45.5±0.2 ^b	4	48.9±0.4	3

Tableau 2.4 Comparaison de la méthode de Laisk & Sumberg (1995) avec notre méthode corrigée chez le laurier rose, pour différentes valeurs de K_c . La première valeur de K_c (247 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) est celle estimée par Von Caemmerer *et al.*, 1994 chez le tabac W38, et la seconde (629 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) est la plus forte valeur estimée chez une plante en C3. Les chiffres entre parenthèse distinguent les différentes méthodes utilisées pour estimer σ^* et S (cf. légende du tableau 2.3). Pour les estimations de σ^* , les résultats avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$).

S (1)	σ^* (1), μbar	σ_0 , μbar	$K_c=247 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$		$K_c=629 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$		n	σ^* (3), μbar	n
			S (2)	σ^* (2), μbar	S (2)	σ^* (2), μbar			
89.0±6.2	44.7±3.2 ^a	8.6±2.4	114.3±14.9	35.3±5.3 ^b	97.9±9.5	40.9±4.5 ^a	3	44.8±1.9 ^a	2

1995 modifiée a été également utilisée chez de jeunes chênes verts pour les températures foliaires de 20 et 25°C chez des feuilles de 1 an (saison de végétation 1999), et pour une température de 25°C pour les feuilles nouvellement formées de l'année 2000 (tableau 2.5). La spécificité de la Rubisco et G^* sont significativement affectés par la température foliaire, mais ne sont pas significativement différents entre les feuilles de 1 an et les feuilles nouvellement formées.

Dans tous les cas, on observe que G_0 est non nul (de 3.4 à 8.6 μbar).

II.4.4 Discussion

II.4.4.1 : Courbes de réponse de A_n à C_e sous plusieurs éclairagements

Nos résultats montrent que la respiration à l'obscurité est en partie inhibée à la lumière (31 à 66% d'inhibition selon les espèces), et cela même à faible éclairagement. Ce phénomène a déjà été décrit chez d'autres espèces, mais peu de données sont disponibles chez les ligneux (cf. chapitre I). Chez le Noyer, R_d et R_{obs} sont significativement affectés par le traitement ombre, tandis que le traitement double CO_2 n'a pas d'effet par rapport au feuilles témoin de lumière. Le pourcentage d'inhibition par la lumière n'a toutefois pas été affecté de manière significative par les traitements d'ombre et fort CO_2 .

G^* apparent ne constitue pas une bonne approximation de G^* chez les espèces ayant une faible conductance interne et une respiration à la lumière élevée. Dans notre étude, G^* a été sous estimé de 2 à 8 μbar en absence de prise en compte g_i pour son calcul. Certaines données publiées utilisant la méthode de PROGCOMP ENRfu Brooks et Farquhar, 1985 sans correction chez des espèces ayant une forte g_i sont sous-estimées et doivent donc être considérées avec précaution. Toutefois, le modèle simple proposé par PROGCOMP ENRfu Von Caemmerer, et al., 1994 pour corriger G^* apparent (cf. équation 2.32) pose comme hypothèse que les résistances à la diffusion du CO_2 sont les même entre les mitochondries et l'air ambiant qu'entre les chloroplastes et l'air ambiant, ce qui est théoriquement inexact (cf. chapitre I). Les principaux inconvénients de cette méthode sont sa lenteur (une journée pour une mesure) et sa complexité à mettre en œuvre. Ces inconvénients nous ont conduits à nous intéresser à la méthode de Sumberg et Laisk, 1995.

Tableau 2.5 Estimation de S et σ^* par la méthode de Laisk & Sumberg (1995) chez des feuilles de chêne vert nouvellement formées, et de l'années précédente. Pour chaque colonne, les résultats avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$). Pour un âge de feuille donné, σ^* et S sont significativement différents entre les températures 20 et 25°C (test de Student apparié, $\alpha=0.05$, résultats du test non présentés sur le tableau).

Age des feuilles	S à 25°C	σ^* à 25°C, μbar	σ_0 , μbar	n	S à 20°C	σ^* à 20°C, μbar	σ_0 , μbar	n
de 1 an (1999)	94.5±8.5 ^a	42.5±4.1 ^b	5.8±2.3 ^a	7	117.9±21.8	34.4±5.4	5.3±3.8	4
de l'année (2000)	90.6±6.2 ^a	44.2±3.5 ^b	5.7±0.5 ^a	3	nd	nd	nd	
Moyennes	93.3±7.8	43.0±3.8	5.8±1.9	10				

II.4.4.2 : Relation entre le point de compensation pour le CO₂ et la concentration en oxygène

Les principaux avantages de cette méthode résident dans sa simplicité, sa rapidité à mettre en œuvre, ainsi que le fait qu'il n'y a pas de correctif à faire pour la conductance interne. En effet, au point de compensation, il n'y a plus de flux net de CO₂ ($A_n=0$), et donc plus de gradient de pression partielle de CO₂ entre la Rubisco et l'air ambiant.

Pour nos expérimentations, \square_0 n'est jamais nul, ce qui contredit les hypothèses posées par Sumberg et Laisk, 1995. Cette variabilité de \square_0 peut s'expliquer d'après l'équation (2.39) par le fait que le ratio R_d / V_c^{\max} ne peut pas être négligé, même à très fort éclaircissement. Ces observations nous ont conduit à corriger cette méthode grâce à l'équation (2.42), en prenant en compte le ratio R_d / V_c^{\max} . Ainsi, la méthode corrigée appliquée au tabac W38 (dont on connaît K_c et le ratio V_c^{\max} / V_o^{\max} , qui ont été estimés *in vivo* par Von Caemmerer, *et al.*, 1994) donne des résultats très proches de ceux obtenus par Von Caemmerer, *et al.*, 1994 par la méthode de Brooks et Farquhar, 1985 corrigée pour la conductance interne (tableau 2.3). Pour le chêne vert, on observe également une excellente adéquation entre S à 25°C estimé par cette méthode (93.3 ± 7.8) et S estimé *in vitro* (93.3 ± 4.5 , Balaguer, *et al.*, 1996). Par contre, chez les autres espèces étudiées (peuplier "peace" et laurier rose, tableaux 2.3 et 2.4), la méthode de Sumberg et Laisk, 1995 corrigée fournit des estimations de \square^* significativement plus faibles que celles obtenus par la méthode de Brooks et Farquhar, 1985 corrigée pour g^i (tableau 2.1). Laisk et Loreto, 1996, en utilisant la méthode de Sumberg et Laisk, 1995, obtiennent également des valeurs de \square^* plus faibles que celles généralement rapportées dans la littérature. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la méthode utilisée est très sensible à K_c (*cf.* tableau 2.4), et que l'on ne dispose pas d'informations suffisamment précises sur la variabilité des constantes cinétiques de la Rubisco.

II.4.4.3 : Variabilité inter et intraspécifique

Une revue des données disponibles (*cf.* revue de Evans et Loreto, 2000) montre que \square^* varie de 33 à 55 μbar selon les espèces et les techniques utilisées. Toutefois, très peu de données sont disponibles chez les ligneux. A l'exception du tabac W38, nos estimations de \square^* varient de 43.0 à 50.5 μbar , et se situent donc dans la partie haute de la gamme de \square^* publiés. Le \square^* observé chez le Noyer (50.5 μbar) est un des plus élevés jamais estimé (*cf.* tableau 2.5).

Chez le Noyer, Γ^* ne diffère pas significativement entre les trois traitements, et un Γ^* moyen ($50.5 \mu\text{bar}$) sera utilisé pour les estimations de conductance interne. Etant donné le faible nombre de répétitions, l'hypothèse d'une variabilité intraspécifique de Γ^* en réponse à l'éclairement ou à un enrichissement au CO_2 ne peut pas être exclue. Une absence de variabilité de Γ^* en réponse à un enrichissement en CO_2 a déjà été observée par Habash, *et al.*, 1995, mais il n'existe aucune autre étude sur la variabilité intraspécifique en réponse à différents facteurs comme l'éclairement. Chez le chêne vert, il n'a pas été possible de mettre en évidence de différence significative entre les feuilles nouvellement formées et celles âgées de 1 an (tableau 2.4).

Les facteurs déterminant les variations interspécifiques de S et de Γ^* , ainsi que des constantes cinétiques K_c et K_o sont très mal connus. On peut toutefois suspecter qu'une faible variabilité interspécifique de la structure de la Rubisco puisse expliquer cette variabilité. Ainsi, des études récentes réalisées sur le tabac ont montré qu'une mutation sur un acide aminé proche du site actif peut fortement réduire S (Whitney, *et al.*, 1999).

II.4.5 Conclusion

L'approche dérivée de Sumberg et Laisk, 1995 est rapide et facile à mettre en œuvre, mais ne semble donner de bons résultats que si l'on connaît précisément K_c et le ratio $V_c^{\text{max}} / V_o^{\text{max}}$ (*cf.* résultats obtenus pour le tabac W38). L'approche dérivée de Brooks et Farquhar, 1985 corrigée pour la conductance interne se révèle donc être plus fiable pour les autres espèces, en dépit de sa complexité à mettre en œuvre. Au cours de cette thèse, nous utiliserons pour estimer g^i par couplage échanges gazeux / fluorescence les résultats de cette dernière méthode pour le peuplier, le rosier, le lamier, le laurier rose (tableau 2.1) et le Noyer (tableau 2.2). La méthode dérivée de Sumberg et Laisk, 1995 ne sera utilisée que pour le chêne vert pour la température foliaire de 20°C (tableau 2.5).

Il est important de ne pas perdre de vue le fait que les estimations de Γ^* publiées utilisant la méthode de Brooks et Farquhar, 1985 (à l'exception de Von Caemmerer, *et al.*, 1994) sont des valeurs apparentes. Γ^* apparent ne peut être considéré comme une bonne approximation de Γ^* que chez des espèces dont on suppose une forte conductance interne (*i.e.* des végétaux ayant une très forte assimilation nette, *cf.* chapitre IV).

Etant donné la variabilité de \square^* , il se révèle indispensable d'estimer ce paramètre préalablement à toute étude de g^i par couplage échanges gazeux / fluorescence chez une espèce donnée.

CHAPITRE III

Origines de la limitation interne

III.1 Introduction

La résistance interne à la diffusion du CO₂ dans le modèle simple de résistances en séries (*cf.* chapitre I) est la résultante d'une résistance en phase gazeuse intercellulaire et d'une résistance en phase liquide cellulaire. Si de plus en plus de travaux ont quantifié la conductance interne, les grandeurs de ces deux composantes sont très mal connues, et à l'heure actuelle aucun travail expérimental n'a permis de les quantifier. Une résistance en phase gaz a été introduite implicitement dans certains modèles de photosynthèse foliaire (*eg.* Jarvis, 1971, Chartier et Bethenod, 1977, Prioul et Chartier, 1977, Rand, 1978), puis a été négligée. Il en va de même de la limitation interne dans le très utilisé modèle de Farquhar *et al.* (Farquhar, *et al.*, 1980).

Le fait que la diffusion du CO₂ dans l'eau soit beaucoup plus difficile que dans l'air (*cf.* chapitre I, ainsi que Nobel, 1991) a mené beaucoup d'auteurs à considérer *a priori* la résistance en phase liquide comme la principale composante de la limitation interne. Des caractéristiques ultrastructurales cellulaires telles que la disposition des chloroplastes, ou l'épaisseur de la paroi sont susceptibles d'influencer la conductance interne (*cf.* chapitre I). L'existence de transporteurs actifs de CO₂ facilitant la diffusion par les membranes reste quant à elle hypothétique. D'autre part, l'anhydrase carbonique, une enzyme cellulaire localisée principalement dans le stroma chloroplastique et catalysant l'interconversion CO₂/HCO₃⁻, aurait un rôle de facilitation de la diffusion du CO₂ dans le chloroplaste (*cf.* Cowan, 1986 et chapitre I). Plusieurs travaux émettent ainsi la théorie qu'une forte activité anhydrase permettrait de compenser une faible conductance au CO₂ de la paroi cellulaire chez les ligneux, en augmentant la conductance au CO₂ dans le chloroplaste (Price, *et al.*, 1994, Gillon et Yakir, 2000).

D'autres auteurs ont insisté sur l'importance de l'autre composante de la conductance interne : le transfert en phase gazeuse intercellulaire (*cf.* Parkhurst, 1994 pour une revue). Il a ainsi été proposé que la résistance intercellulaire puisse représenter une contrainte évolutive, ayant abouti à des modifications de l'organisation du mésophylle (épaisseur des assises, taille et arrangement des cellules, cloisonnement ou non des aréoles), et inversement. La répartition des stomates (espacement des stomates, et répartition entre les deux surfaces foliaires) est également susceptible d'avoir une influence sur le transfert intercellulaire. Ainsi, une plus faible résistance intercellulaire pourrait être obtenue en minimisant l'épaisseur foliaire (Nobel, 1991, Parkhurst, 1994, Rand, 1978, Terashima, *et al.*, 2001), ou en favorisant la présence de stomates sur la face adaxiale pour minimiser le trajet de diffusion du CO₂ (Mott, *et al.*, 1982,

Parkhurst, 1994, Parkhurst, *et al.*, 1988, Parkhurst et Mott, 1990). Une forte résistance intercellulaire pourrait également être compensée en favorisant la diffusion en phase liquide en augmentant la surface cellulaire disponible aux échanges de CO₂ (Nobel, 1991, Parkhurst, 1994, Terashima, *et al.*, 2001).

Lors d'une expérimentation destinée à valider la technique d'estimation de C_{es} (*cf.* chapitre II), Sharkey, *et al.*, 1982 ont montré qu'il existe une légère différence entre les C_{es} estimés sur les deux faces d'une feuille amphistome (entre 3 et 9 μmol.mol⁻¹ chez *Xanthium strumarium* L et *Gossypium hirsutum* L), suggérant ainsi un gradient de fraction molaire dans les espaces gazeux intercellulaires du mésophylle. Mott et O'Leary, 1984 et Parkhurst, *et al.*, 1988, en utilisant une approche dérivée de celle de Sharkey, *et al.*, 1982 ont confirmé l'existence d'une telle différence entre deux faces foliaires pour plusieurs plantes ayant des feuilles amphistomes (10 μmol.mol⁻¹ en moyenne). Une autre approche expérimentale, mise au point par Parkhurst et Mott, 1990, a consisté à estimer si l'assimilation foliaire est limitée par la résistance en phase gazeuse intercellulaire chez cinq plantes avec des feuilles hypostomes et six plantes ayant des feuilles amphistomes. Cette approche a consisté à faciliter la diffusion du CO₂ dans la phase gazeuse du mésophylle grâce à l'utilisation d'un système ouvert d'échanges gazeux utilisant de l'hélox (mélange gazeux à base d'hélium et d'oxygène. En effet, la diffusivité du CO₂ est 2.33 fois plus élevée dans l'hélox que dans l'air (*cf.* tableau 3.1) □ lors d'une transition air / hélox, les conductances stomatiques (g^s) et intercellulaire (g^{ias}) augmentent théoriquement d'un facteur 2.33 (et la conductance de couche limite d'un facteur 2.33 à la puissance 2/3), tandis que la conductance en phase liquide (g^{liq}) n'est pas affectée. La transition de l'air vers l'hélox a augmenté en moyenne l'assimilation nette de 2% chez les feuilles amphistomes, et de 12% chez les feuilles hypostomes (mesuré pour un C_{es} d'environ 20 Pa, et un éclaircissement saturant). Ces résultats suggèrent que la résistance intercellulaire est une composante faible mais non négligeable de la résistance interne, et qu'elle est dépendante de l'anatomie foliaire. Toutefois, Parkhurst et Mott, 1990 n'ont pas en mesure de quantifier la résistance interne, ni ses deux composantes liquide et gazeuse.

A partir d'un jeu de données expérimentales obtenues chez quatre ligneux hypostomes (estimation de la conductance interne par la technique reposant sur la discrimination du ¹³CO₂, et quantifications anatomiques), Syvertsen, *et al.*, 1995 ont proposé un modèle simple en une dimension permettant de dissocier les deux composantes de la résistance interne. Leur modèle suppose que la résistance en phase gaz est liée à la "tortuosité" du trajet gazeux (*cf.* Ball, 1981) dans les espaces intercellulaires, et que la résistance en phase liquide est liée à la densité des tissus du mésophylle et à la surface cumulée de chloroplastes exposés aux espaces

intercellulaires. Les résultats de leur modèle suggèrent que la résistance en phase liquide est la principale composante de la résistance interne, et cela même chez les feuilles hypostomes les plus épaisses. Ces résultats sont renforcés par un autre travail de modélisation, réalisé par Terashima, *et al.*, 2001 grâce à un modèle en une dimension, qui suggère que chez les espèces présentant une faible résistance interne, la résistance en phase liquide est largement supérieure à celle en phase gaz. Leurs simulations prévoient également que la majeure partie des variations de résistance interne résulte de variations de résistance en phase liquide.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre de quantifier expérimentalement les résistances en phase gazeuse et en phase liquide en utilisant une approche originale (dérivée de celle de Parkhurst et Mott, 1990), basée sur des estimations de la conductance interne dans l'air et dans un mélange gazeux (l'hélox) permettant d'élever la diffusivité du CO₂ dans la phase gazeuse, sans affecter sa diffusion en phase liquide cellulaire. Cette étude sera réalisée chez des ligneux ayant des anatomies foliaires très contrastées (épaisseur, répartition des stomates, organisation du mésophylle).

III.2 Matériel et méthodes

III.2.1 : Matériel végétal

Les expérimentations ont été réalisées sur quatre ligneux des peupliers hybrides *Populus koreana x trichocarpa* cv "peace" âgés de 1 à 3 ans (provenant de l'INRA de Nancy), des rosiers *Rosa rubiginosa*, prélevés sur campus d'Orsay et entretenus plusieurs années en serre, de jeunes chênes verts (*Quercus ilex*, provenant l'INRA de Nancy), et des lauriers roses (*Nerium oleander*). Il s'agit de jeunes ligneux cultivés sous serre à Orsay dans des pots de 5 à 20 l, sur un mélange de sable et de tourbe (1/1 v/v). L'irrigation du rosier, du chêne et du laurier rose a été assurée par un dispositif automatique, tandis que les peupliers ont été placés constamment dans des bacs remplis d'eau. La fertilisation a été obtenue à l'aide d'engrais à libération lente (Nutricote) renouvelé tous les trois mois. Le peuplier, le rosier et le laurier rose ont été maintenus dans une serre climatisée avec une température moyenne entre 20 et 25°C (pouvant excéder 30°C certains jours d'été). Pendant l'hiver, un éclairage additionnel a été assuré par des lampes à décharge (Osram HQI 400W) avec une photopériode de 14 h. Le chêne vert a été maintenu dans une serre non climatisée (chauffée l'hiver) sans éclairage additionnel.

Table 3.1 Diffusivités théoriques du CO₂ et de la vapeur d'eau dans divers gaz ou mélanges gazeux, pour une température de 25°C et une pression atmosphérique de 101.3 kPa. Sources Egorov *et al.* (1988) pour la vapeur d'eau, et Masson *et al.* (1970) pour le CO₂.

Gaz ou mélange gazeux	D _{CO₂} cm ² .s ⁻¹	D _{H₂O} cm ² .s ⁻¹
Air	0.160	0.253
Hélox	0.410	0.590
Azote	0.160	0.250
Hélium	0.580	0.870
Vapeur d'eau	0.162	-

Les expérimentations ont toutes été réalisées sur feuille détachée (*cf.* Annexe I). Pour le peuplier Peace, des feuilles matures ont été prélevées entre le 6^{ème} et le 9^{ème} rang en partant de l'apex. Pour le chêne vert, les feuilles choisies sont toutes âgées de 1 an (saison de végétation précédente).

III.2.2 Echanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne

III.2.2.1 Quantification des composantes liquide et gazeuse de la conductance interne, grâce à l'utilisation de mélanges gazeux à base d'hélium

Bases théoriques

Le modèle simple de diffusion du CO₂ dans la feuille présentée dans le chapitre I permet de décomposer la résistance interne en une résistance en phase gazeuse des espaces intercellulaires (r^{ias} , *ias* pour "intercellular air spaces") et une résistance en phase liquide cellulaire (r^{liq}). On considère que les deux résistances sont placées en série

$$r^i = r^{ias} + r^{liq}, \text{ soit } \frac{1}{g^i} = \frac{1}{g^{ias}} + \frac{1}{g^{liq}}$$

Nous avons utilisé une approche expérimentale consistant à augmenter la diffusivité du CO₂ dans la phase gazeuse, en modifiant la composition du mélange gazeux. Ce type d'approche a été utilisée pour la première fois chez des végétaux par Egorov et Karpushkin, 1988 pour estimer la pression partielle de vapeur d'eau aux surfaces évaporantes des espaces intercellulaires. Parkhurst, 1994 ont ensuite appliqué cette approche pour l'étude de la diffusion du CO₂ dans les espaces intercellulaires. Leur méthode a consisté à faciliter la diffusion du CO₂ dans la phase gazeuse du mésophylle grâce à l'utilisation d'un système ouvert d'échanges gazeux utilisant de l'hélox (mélange gazeux à base d'hélium et d'oxygène dans les proportions 0.21% O₂ et 0.79% He). En effet, la diffusivité du CO₂ est 2.33 fois plus élevée dans l'hélox que dans l'air (*cf.* tableau 3.1) lors d'une transition air / hélox, les conductances stomatique et intercellulaire augmentent théoriquement d'un facteur 2.33, et la conductance de couche limite d'un facteur 2.33 à la puissance 2/3, tandis que la conductance en phase liquide n'est pas affectée. Toutefois, cette méthode permet d'estimer si l'assimilation foliaire est limitée par la résistance en phase gazeuse intercellulaire, mais n'autorise pas de quantification de g^i , g^{ias} et g^{liq} . En nous basant sur les travaux de Parkhurst et Mott, 1990, nous

avons proposé une approche originale couplant échange gazeux et fluorescence chlorophyllienne permettant une quantification des composantes de g^i .

Echanges gazeux foliaires dans une atmosphère à base d'hélium

Les propriétés d'absorption du CO_2 et de l' H_2O dans l'infrarouge sont affectées par la composition du mélange gazeux par un phénomène dit de "band-broadening" (cf. annexe II pour une définition). Ainsi, les équations permettant de convertir le signal brut de l'IRGA en fractions molaires doivent être modifiées pour être utilisées dans hélium et l'hélox. Les nouvelles équations et les nouveaux paramètres sont décrits dans l'annexe II. Les débitmètres massiques (mesurant un débit sur la base d'un transport de chaleur) utilisés dans les dispositifs d'échanges gazeux doivent également être soigneusement réétalonnés, car les propriétés thermiques des mélanges gazeux à base d'hélium diffèrent fortement de l'azote et de l'air.

D'autre part, l'hélium est une molécule qui diffuse beaucoup plus facilement que l'azote, l'oxygène ou le CO_2 par d'éventuels pores ou au travers des joints utilisés pour assurer l'étanchéité du dispositif. Un soin particulier a été apporté à la conception de notre dispositif d'échanges gazeux (décrit dans l'annexe I) de manière à éviter ces problèmes de fuite et de diffusion. La chambre d'échanges gazeux a été équipée d'un dispositif original conçu pendant ma thèse (décrit dans l'annexe III) de manière à réduire fortement la diffusion par les joints en mousse utilisés pour "pincer" la feuille.

La troisième difficulté liée à l'utilisation de mélanges gazeux à base d'hélium est que l'équation permettant de calculer la fraction molaire de CO_2 dans les espaces évaporant intercellulaires (C_{es}) n'est plus valable dans une atmosphère à base d'hélium (Parkhurst et Mott, 1990). En effet, Von Caemmerer et Farquhar, 1981 observent que la diffusivité du CO_2 dans la vapeur d'eau est la même que dans l'azote, ce qui leur permet de simplifier l'expression (2.9). Cette simplification n'est malheureusement plus valable dans les gaz vecteurs autres que l'air et l'azote, et nous conduit à utiliser une autre relation plus complexe développée par Parkhurst et Mott, 1990. En développant l'équation (2.9), on obtient ainsi une relation valable quelque soit le mélange gazeux utilisé :

$$C_{es} = \frac{C_a \left[\frac{1}{2 \cdot g'_{cw}} \cdot E + \frac{1}{g'_{cx}} \cdot \frac{C_a}{2} \right] + \bar{w} \left[\frac{1}{g'_{cx}} \cdot \frac{1}{g'_{cw}} \cdot A_n \right]}{1 + \left[\frac{1}{2 \cdot g'_{cw}} \cdot E + \frac{1}{2 \cdot g'_{cx}} \cdot A_n \right]} \quad (3.1)$$

Toutes les autres équations pour calculer les échanges gazeux présentées dans le chapitre II sont utilisables dans l'hélium et l'hélox, à condition d'utiliser les diffusivités correspondant au mélange gazeux utilisé (tableau 3.1). La conductance interne peut ensuite être estimée aussi bien dans l'air que dans l'hélox, grâce à la méthode reposant sur un couplage échange gazeux-fluorescence choisie pour cette thèse.

Quantification de la conductance des espaces gazeux intercellulaires et de la conductance en phase liquide

Les conductances internes dans l'air (g_{air}^i) et dans l'hélox (g_{helox}^i) doivent tout d'abord être estimées sur la même feuille. Une approche originale a été développée pour estimer la conductance au CO_2 dans les espaces gazeux intercellulaires (g_{air}^{ias}) et la conductance en phase liquide cellulaire (g^{liq}). En considérant le modèle simple de résistances en série, on peut décomposer les conductances internes dans l'air et dans l'hélox d'après les relations

$$\frac{1}{g_{air}^i} = \frac{1}{g_{air}^{ias}} + \frac{1}{g^{liq}} \quad \text{et} \quad \frac{1}{g_{helox}^i} = \frac{1}{g_{helox}^{ias}} + \frac{1}{g^{liq}} \quad (3.2) \text{ et } (3.3)$$

g^{liq} reste théoriquement constant quelque soit le mélange gazeux utilisé, et g_{air}^i est toujours théoriquement inférieur ou égal à g_{helox}^i . Si l'on observe que $g_{air}^i < g_{helox}^i$ c'est donc parce que $g_{air}^{ias} < g_{helox}^{ias}$. En couplant les équations (3.2) et (3.3), on peut écrire :

$$\frac{1}{g_{air}^i} - \frac{1}{g_{helox}^i} = \frac{1}{g_{air}^{ias}} - \frac{1}{g_{helox}^{ias}} \quad (3.4)$$

Par ailleurs, et de manière analogue à la diffusion par les stomates, on peut écrire

$$g_{helox}^{ias} = g_{air}^{ias} \cdot K \quad \text{avec} \quad K = \frac{D_{c,hx}}{D_{c,a}} \quad (3.5)$$

K étant le rapport des diffusivités du CO_2 entre l'hélox et l'air (cf. tableau 3.1). En couplant les équations (3.4) et (3.5), on peut exprimer g_{air}^{ias} d'après l'équation suivante

$$g_{air}^{ias} = \frac{1 - K}{\frac{1}{g_{air}^i} - \frac{1}{g_{helox}^i}} \quad (3.6)$$

Connaissant g_{air}^i et g_{helox}^i , il est possible de calculer g^{liq} d'après l'équation suivante (dérivée de l'équation 3.2)

$$g^{liq} = \frac{1}{\frac{1}{g_{air}^i} - \frac{1}{g_{air}^{ias}}} \quad (3.7)$$

Remarques

Cette approche originale utilisant l'hélox permet pour la première fois de quantifier expérimentalement les composantes en phase gazeuse et en phase liquide de la conductance interne. Toutefois, la réalisation de mesures d'échanges gazeux avec des mélanges à base d'hélium est particulièrement délicate et complexe à mettre en œuvre. La mise au point du dispositif d'échanges gazeux est longue, et les sources d'erreurs sont nombreuses. Ces problèmes font que la réalisation d'échanges gazeux sous hélium n'a été utilisée que très rarement, et son emploi sur le terrain difficilement envisageable. D'autres approches peuvent être imaginées pour faire varier la diffusivité du CO₂, comme diminuer la pression atmosphérique (ce qui a pour effet de diminuer D_c), ou bien utiliser un gaz vecteur organique "lourd" tel qu'un fluorocarbure (élévation de D_c), mais ces méthodes complexes n'ont jamais été menées à bien.

III.2.2.2 Estimation du rapport des diffusivités de la vapeur d'eau entre deux mélanges gazeux

Il est nécessaire de connaître le rapport des diffusivités du CO₂ entre l'hélox et l'air (K) pour estimer les conductances en phase gazeuse et en phase liquide. Les valeurs théoriques de ce rapport sont connues (cf. Egorov et Karpushkin, 1988, Mason et Marrero, 1970), et ce rapport peut être également estimé expérimentalement *in vivo* grâce à notre dispositif d'échanges gazeux (Parkhurst et Mott, 1990).

D'après l'équation (2.7), la conductance stomatique dans l'hélox peut être exprimée d'après la conductance stomatique dans l'air :

$$g_{w.helox}^s = g_{w.air}^s \frac{D_{w.hx}}{D_{w.a}} \quad (3.8)$$

Si l'ouverture stomatique reste constante, et si l'on a estimé les conductances stomatiques dans les deux mélanges gazeux, le rapport des diffusivités de la vapeur d'eau entre l'hélox et l'air peut être estimé en réarrangeant l'équation (3.8), soit

$$\frac{D_{w.hx}}{D_{w.a}} = \frac{g_{w.hx}^s}{g_{w.a}^s} \quad (3.9)$$

Cette méthode a été utilisée avec succès par Parkhurst et Mott, 1990 sur une réplique de feuille (surface évaporante recouverte d'une plaque métallique percée de pores de petite taille simulant des stomates). L'utilisation de cette méthode sur du matériel végétal a comme

inconvenient majeur d'être sensible à une variation de l'ouverture des stomates lors du changement de composition de l'atmosphère, ce qui rend la mesure peu fiable. Parkhurst et Mott, 1990 ont proposé de mesurer successivement les conductances dans les deux mélanges gazeux, suffisamment rapidement pour que l'ouverture stomatique varie le moins possible. Un retour dans l'air permet de s'assurer que l'ouverture stomatique n'a pas été affectée par le passage dans l'hélox. Notre dispositif expérimental a été modifié de manière à augmenter l'humidité du gaz vecteur hélox et hélium, de manière à ce que la transpiration reste constante lors de la transition air / hélox et N_2 / He (cf. Annexe I).

III.2.2.3 : Matériel et protocoles expérimentaux

Un système d'échanges gazeux modifié pour utiliser des atmosphères à base d'hélium, a été couplé à un dispositif d'imagerie de la fluorescence chlorophyllienne (cf. Annexe I). La conductance interne a été estimée à l'aide du protocole à "flux d'électrons variable" décrit dans le chapitre II, dans l'air et dans l'hélox.

La respiration à l'obscurité est tout d'abord mesurée dans l'air, puis dans l'hélox. La feuille est ensuite adaptée à la lumière dans l'air, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Chaque point de la courbe A_n vs C_{es} est mesuré successivement dans l'air et dans l'hélox par palier de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (exemple de séquence □ air 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ / hélox 350 / hélox 300 / air 300 / air 250 / hélox 250 / hélox 200 / air 200 / air 150 / hélox 150 / hélox 100 / air 100 / hélox 50 / hélox 350 / air 350). La diffusivité de la vapeur d'eau dans l'hélox étant plus élevée que dans l'air (tableau 3.1), la transpiration foliaire augmente fortement sous hélox. Le passage de l'air vers l'hélox peut donc potentiellement provoquer une fermeture des stomates (Mott et Parkhurst, 1991). Pour éviter cet inconvénient, l'humidité de l'air est augmentée à chaque passage dans l'hélox, puis diminuée à chaque retour dans l'air, de manière à n'induire que de faibles variations de transpiration.

Le flux d'électrons (J) a été estimé pour le peuplier "peace" et le rosier en calibrant \square_{PSII} estimé par la fluorescence chlorophyllienne avec \square_e estimé par les échanges gazeux. Cet étalonnage a été réalisé en fin d'expérimentation, en conditions "non photorespiratoires" obtenues dans de l'azote ou de l'hélium avec une fraction molaire d'oxygène inférieure à 1%. Pour le laurier rose et le chêne vert, le flux d'électrons a été calculé à partir de l'absorptance foliaire dans le bleu (0.824 pour le chêne et 0.881 pour le laurier rose), grâce à la méthode décrite dans l'annexe I.

Un ajustement à l'aide du logiciel Sigma-Plot est réalisé sur au moins 4 points $A_n/C_{es}/J$ dans l'air puis 4 point dans l'helox pour estimer g^i dans les deux mélanges gazeux à l'aide de l'équation (2.17).

III.2.3 : Microscopie et mesures anatomiques

III.2.3.1 : Microscopie optique

Des coupes transversales foliaires sur des feuilles similaires à celles utilisées pour les échanges gazeux, ont été réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir, et montées dans l'eau entre lame et lamelle. Les observations ont été effectuées en fluorescence (éclairage dans l'UV et collecte de la fluorescence dans le rouge), grâce à un microscope optique Leica en épifluorescence (DM RXA) équipé d'un système d'imagerie par CCD. Les observations à l'oculaire nous ont permis d'identifier le type d'organisation du mésophylle (hétérobarique / homobarique). Des images ont été prises, puis ont été ensuite analysées à l'aide de NIH-Image (version SXM, NIH, USA), afin d'estimer l'épaisseur des différentes assises cellulaires.

III.2.3.2 : Estimation de la fraction de volume d'espaces gazeux foliaire

La fraction de volume d'espaces gazeux foliaire à été estimée par infiltration sous vide d'une solution de Triton X-100 (Sigma Chemicals) à 0.1% dans de l'eau distillée. La solution est dégazée sous vide avant l'expérimentation. Un disque foliaire (de 0.5 à 2cm de diamètre) est prélevé dans le limbe en évitant les nervures principales. Les stomates doivent être ouverts pour que l'infiltration puisse être réalisée, et il est nécessaire de s'en assurer à l'aide d'un système d'échanges gazeux ou d'un poromètre. La masse fraîche du disque est mesurée (M_F), puis le disque est immergé dans un récipient contenant la solution de Triton X-100. Le récipient est ensuite hermétiquement fermé, puis connecté à une pompe à vide (pompe à eau). L'infiltration est considérée comme réussie si l'on observe un changement de couleur uniforme du disque. La masse du disque ainsi infiltré est ensuite mesurée (M_I). La fraction de volume d'espaces gazeux foliaires (f_{ias}) est calculée grâce à la relation□

$$f_{ias} = 1 - \frac{M_F}{M_I} \quad (3.10)$$

Il est important de noter que cette fraction est rapportée au volume total de la feuille. Ayant estimé par microscopie optique la fraction de l'épiderme du limbe occupée par l'épiderme et

la cuticule (\square), il est possible de calculer la fraction de volume d'espaces gazeux du mésophylle (f_{ias}^{mes}) d'après la relation

$$f_{ias}^{mes} = \frac{f_{ias}}{1 - \square} \quad (3.11)$$

III.2.3.3 : Trajet moyen du CO_2 dans le mésophylle et conductance en phase gazeuse d'après le modèle de Syvertsen, et al., 1995

Etant donné la tortuosité du réseau d'espaces gazeux intercellulaires, le trajet effectivement parcouru par le CO_2 dans le mésophylle entre les faces abaxiale et adaxiale est toujours supérieur à l'épaisseur du mésophylle. Une estimation de cette distance effectivement parcourue par le CO_2 dans les espaces gazeux (\square) peut être calculée d'après un modèle en une dimension élaboré par Syvertsen, et al., 1995, reposant sur les travaux de modélisation de Ball, 1981 sur la diffusion du CO_2 dans un milieu poreux (et validé sur la diffusion dans les pores de petite taille d'un sol). Ainsi d'après Syvertsen, et al., 1995, on a :

$$\square = \frac{L(1 - \square)}{f_{ias}^{1.55}} \quad (3.12)$$

Avec L étant l'épaisseur du limbe. La puissance 1,55 permet de prendre en compte la tortuosité du trajet gazeux (Ball, 1981). Ayant estimé \square , Syvertsen, et al., 1995 ont proposé qu'il est possible de calculer une estimation de g^{ias} d'après la relation

$$g^{ias} = \frac{P_{atm}}{\square_{air} D_{c.air}} \cdot \square \quad \text{avec} \quad \frac{P_{atm}}{\square_{air} D_{c.air}} = 1.63 \text{ m.s.}\mu\text{mol}^{-1} \quad (3.13)$$

où P_{atm} est la pression atmosphérique, \square_{air} la densité molaire de l'air, et $D_{c.air}$ la diffusivité du CO_2 dans l'air.

III.2.3.4 : Densité de tissus foliaires

D'après Syvertsen, et al., 1995, connaissant la masse surfacique foliaire (LMA), l'épaisseur (L) et la fraction de volume d'espaces gazeux (f_{ias}), il est possible d'estimer la densité des tissus de la feuille (T_d) par la relation

$$T_d = \frac{LMA}{L(1 - f_{ias})} \quad (3.14)$$

Tableau 3.2 Epaisseurs des assises cellulaires du mésophylle chez les quatre espèces étudiées. L est l'épaisseur moyenne, et L^{\min} et L^{\max} sont respectivement les épaisseurs foliaires minimales et maximales de feuilles prélevées. \square est la fraction de l'épaisseur du limbe occupée par l'épiderme et la cuticule. Les épaisseurs des parenchymes palissadique et lacuneux, ainsi que la profondeur des cryptes sont données en fraction de l'épaisseur du limbe. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\square=0.05$).

Espèce	L μm	L^{\min} μm	L^{\max} μm	\square	Parenchyme palissadique	Parenchyme lacuneux	Profondeur d'une crypte	n
Peuplier "Peace"	222 \pm 63	111	353	0.13 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.05 ^{ac}	0.52 \pm 0.07 ^a	non	16
Rosier	152 \pm 24	111	203	0.25 \pm 0.03 ^b	0.44 \pm 0.03 ^b	0.32 \pm 0.03 ^b	non	34
Laurier rose	294 \pm 17	273	319	0.25 \pm 0.04 ^b	0.30 \pm 0.04 ^a	0.38 \pm 0.06 ^{bc}	0.32 \pm 0.05	10
Chêne vert	255 \pm 35	208	323	0.13 \pm 0.03 ^a	0.43 \pm 0.05 ^{bc}	0.45 \pm 0.05 ^{ac}	non	12

Tableau 3.3 Epaisseur du limbe (L), masse surfacique (LMA), densité des tissus foliaires (T_d), fraction de volume d'espaces gazeux du limbe (f_{ias}) et du mésophylle (f_{ias}^{mes}), des quatre espèces étudiées. Ces résultats ont été obtenus pour les feuilles utilisées pour l'expérimentation sous atmosphère modifiée (hélox et hélium). Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\square=0.05$).

Espèce	L mm	LMA g.m^{-2}	T_d kg.m^{-3}	f_{ias}	f_{ias}^{mes}	n
Peuplier "Peace"	0.23 \pm 0.02 ^a	46.3 \pm 9.9 ^a	379 \pm 109 ^a	0.46 \pm 0.04 ^a	0.53 \pm 0.05 ^a	5
Rosier	0.12 \pm 0.02 ^b	37.4 \pm 4.1 ^a	442 \pm 45 ^{ab}	0.27 \pm 0.01 ^b	0.32 \pm 0.01 ^b	3
Laurier rose	0.31 \pm 0.02 ^c	95.2 \pm 8.1 ^b	438 \pm 28 ^{ab}	0.30 \pm 0.06 ^b	0.40 \pm 0.08 ^b	3
Chêne vert	0.28 \pm 0.02 ^c	128.7 \pm 12.3 ^c	541 \pm 60 ^b	0.15 \pm 0.04 ^c	0.16 \pm 0.05 ^c	4

Le LMA comprenant une contribution des tissus épidermiques, il n'est pas possible de calculer la densité des tissus du seul mésophylle.

III.3 □ Résultats

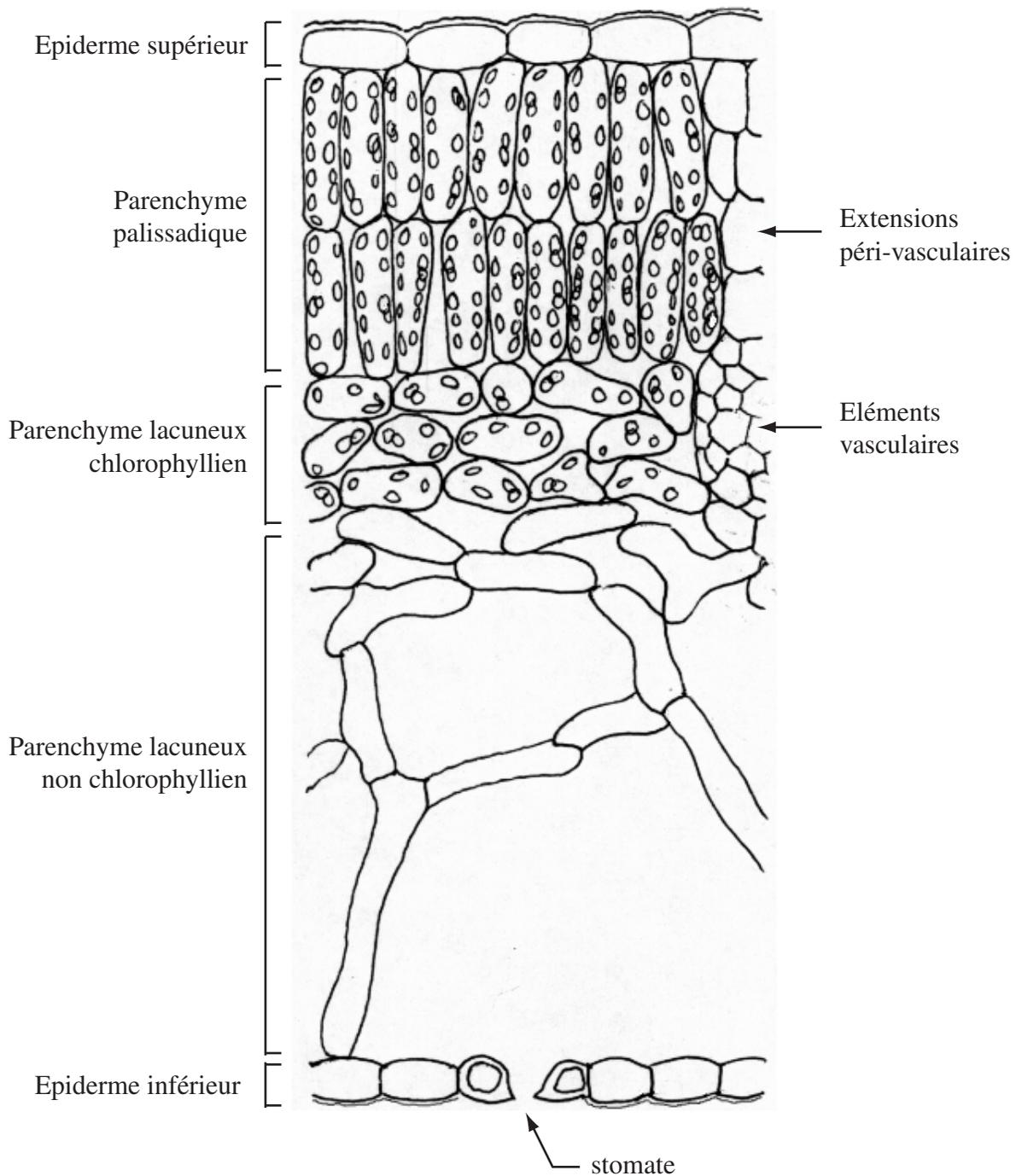
III.3.1 □ Anatomie foliaire

III.3.1.1 : Organisation générale du mésophylle

Les feuilles du peuplier "Peace" sont amphistomes, mais avec une plus forte densité de stomates sur la face abaxiale (ratio = 0.10 ± 0.03 n=6, soit $k_t = 0.84 \pm 0.04$), tandis que les feuilles du rosier, du laurier rose et du chêne vert sont toutes hypostomes. L'épaisseur du limbe est différente entre les espèces et au sein d'un même arbre (tableau 3.2). Par contre, les feuilles sélectionnées pour les échanges gazeux avaient toutes une épaisseur homogène pour une même espèce (tableau 3.3). Les feuilles du laurier rose et du chêne vert sont les plus épaisses (environ 0.3 mm), celles du peuplier hybride ont une épaisseur de l'ordre de 0.2 mm, tandis que celles du rosier sont particulièrement fines (environ 0.1 mm).

Le limbe des quatre ligneux est constitué d'une ou plusieurs assises épidermiques, un parenchyme palissadique constitué d'au moins deux assises cellulaires, et un parenchyme lacuneux. Le rosier et le laurier rose possèdent un épiderme plus épais (25% de l'épaisseur du limbe) que le peuplier et le chêne vert (13%, cf. tableau 3.2). Cet épiderme est constitué d'une seule assise cellulaire, à l'exception du laurier rose qui possède 2 à 4 assises. Le parenchyme palissadique est constitué de 1 à 2 assises cellulaires chez le rosier, 2 assises chez le peuplier et le laurier rose, et de 2 à 3 assises chez le chêne vert. Il est moins épais chez le peuplier et le laurier rose (environ 1/3 de l'épaisseur du limbe) que chez le rosier et le chêne (environ 45% du limbe). Dans tous les cas, il est constitué de cellules en forme de bâtonnet organisées de manière compacte. Le parenchyme lacuneux est quant à lui organisé de manière beaucoup plus lâche que le parenchyme palissadique, et présente chez le rosier, le laurier rose et le chêne vert des cellules chlorophylliennes de forme arrondie. Dans le cas du peuplier "peace", le parenchyme lacuneux est constitué d'une assise cellulaire chlorophyllienne de faible épaisseur (proche du parenchyme palissadique), et d'une assise cellulaire composée de cellules de forme très allongée et qui ont la particularité de ne pas être chlorophylliennes. La structure très particulière du mésophylle de ce peuplier est illustrée dans la figure 3.1. Le

Figure 3.1 : Schéma d'une coupe transversale d'une feuille du peuplier hybride "peace". Les ronds dans les cellules figurent des chloroplastes. Les feuilles de ce peuplier ont la particularité de posséder une assise intermédiaire de parenchyme lacuneux chlorophyllien de faible épaisseur, et une assise de parenchyme lacuneux composé de cellules allongées non chlorophylliennes. L'échelle approximative est de 1cm pour 10 µm.



parenchyme lacuneux est 35% plus épais que le parenchyme palissadique chez le peuplier “Peace” (la moitié de l’épaisseur du limbe) et 21% chez le laurier rose, tandis que ces deux assises sont approximativement d’égale épaisseur chez le chêne vert, et que le parenchyme palissadique est 27% plus épais que le lacuneux chez le rosier. Le laurier rose possède des cryptes (invaginations de l’épiderme abaxial dans le parenchyme lacuneux, dans lesquelles sont localisés les stomates), qui ont une profondeur représentant 32% de l’épaisseur du limbe (tableau 3.2).

III.3.1.2 : Cloisonnement du mésophylle par les éléments vasculaires

Les observations par microscopie optique ont révélé que le peuplier “peace” possède une organisation du mésophylle que l’on pourrait qualifier de “semi-hétérobarique” (les éléments vasculaires cloisonnent le parenchyme palissadique, mais pas le parenchyme lacuneux), tandis que les trois autres espèces sont toutes hétéroplastiques (les éléments vasculaires cloisonnent l’ensemble du mésophylle).

III.3.1.3 : Masse surfacique, densité des tissus du limbe, et fraction de volume des espaces gazeux intercellulaires

La masse surfacique (LMA) est très variable entre les espèces sélectionnées, allant de 37 g.m⁻² pour le rosier à 129 g.m⁻² pour le chêne vert (tableau 3.3). La fraction de volume d’espaces gazeux du mésophylle (f_{ias}^{mes}) varie également fortement entre les espèces. Le chêne vert possède un mésophylle très compact, avec seulement 15% du volume occupé par des espaces gazeux. A l’opposé, le peuplier possède un mésophylle très peu compact, et la moitié du volume est occupé par des espaces gazeux. Le rosier et le laurier rose se situent entre ces deux extrêmes (respectivement 32 et 40% d’espaces gazeux). Toutefois, il est probable que f_{ias} soit surestimé dans le cas du laurier rose, car les cryptes peuvent se remplir d’eau et fausser l’estimation (cf. équation 3.10), mais le calcul d’un correctif ne nous a pas été possible. La densité des tissus foliaires n’est pas significativement différente entre le peuplier, le rosier et le laurier rose. Celle du chêne vert est par contre significativement plus élevée que celle du peuplier. La densité de tissus est toutefois probablement sous-estimée chez le laurier rose, étant donné qu’il est possible que f_{ias} soit surestimé chez cette espèce.

Figure 3.2 Relations entre le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII} , estimé par la fluorescence chlorophyllienne) et le rendement quantique du transfert d'électrons (Φ_e , estimé par les échanges gazeux) dans l'azote (carrés) et l'hélium (triangles) pour le rosier et le peuplier hybride peace. Ces relations ont été obtenues pour une feuille chez le rosier, et pour trois feuilles lors d'expérimentations consécutives chez le peuplier hybride peace.

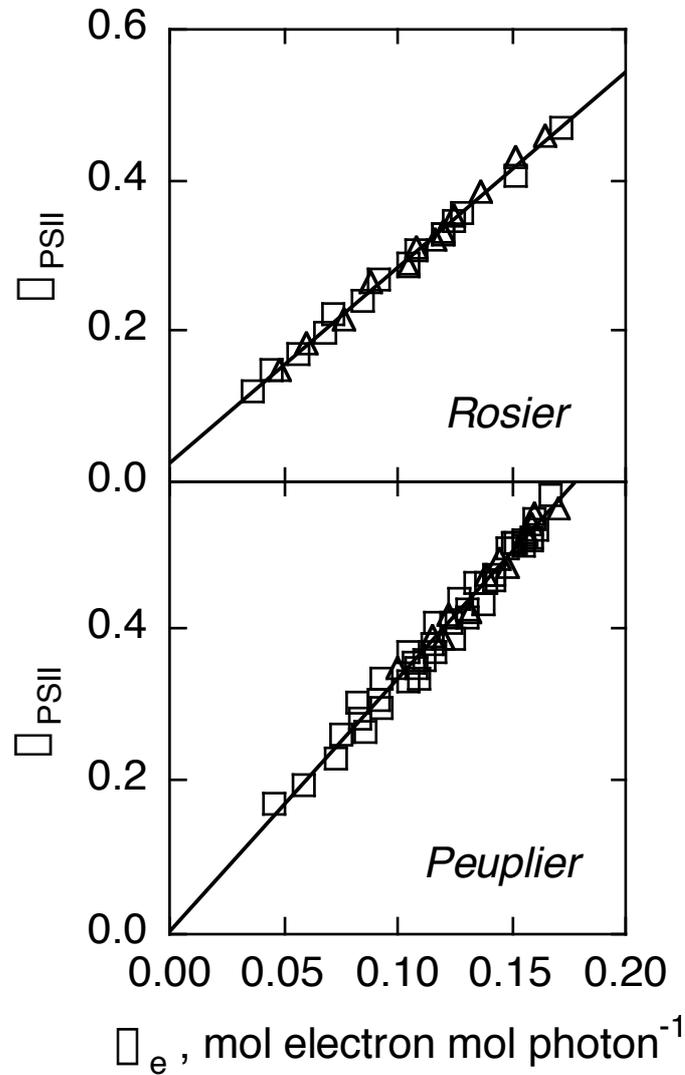
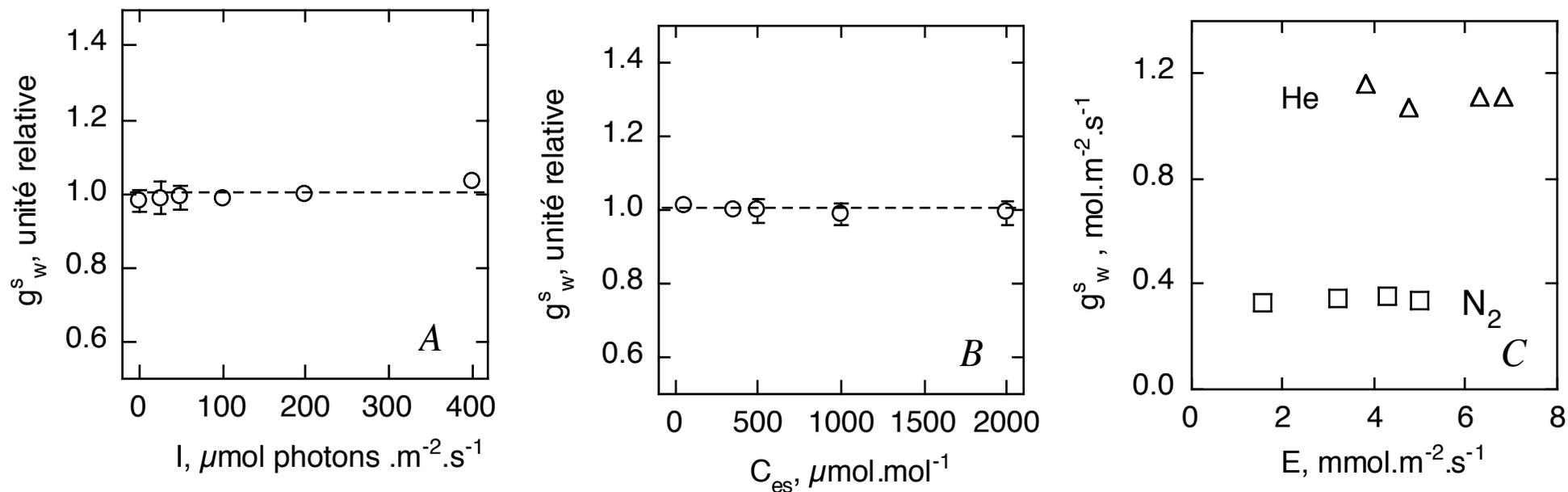


Figure 3.3 Relations entre la conductance stomatique à la vapeur d'eau du peuplier "peace" (g_w^s) et l'éclairement (I , Fig. 3.3A), la fraction molaire de CO_2 aux sites évaporants intercellulaires (C_{es} , Fig. 3.3B), et la transpiration foliaire (E , Fig. 3.3C), estimées dans l'air (ronds), l'azote (carrés) et l'hélium (triangles). La conductance stomatique est exprimée relativement à la conductance à un éclairement de $200 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dans la fig. A, et $C_{es} = 350 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ dans la fig. B. La figure C a été obtenue en faisant varier le VPD de l'air dans la chambre d'échanges gazeux.



III.3.2 Relation entre Φ_{PSII} et Φ_e

Le flux d'électrons a été estimé chez le peuplier et le rosier en calibrant Φ_{PSII} (obtenu par la fluorescence chlorophyllienne) avec Φ_e (obtenu par les échanges gazeux), dans l'azote ou dans l'hélium (conditions non photorespiratoires). La figure 3.2 présente un exemple d'un tel étalonnage dans les deux mélanges gazeux pour le rosier et le peuplier, et montre que les relations estimées dans l'azote ne diffèrent pas de celles réalisées dans l'hélium, et qu'elles sont linéaires avec une ordonnée à l'origine proche de zéro. Ces observations sont valables pour tous les étalonnages réalisés (résultats non présentés).

III.3.3 Fonctionnement stomatique du peuplier hybride "peace", et rapport des diffusivités de la vapeur d'eau entre hélium et air, et entre hélium et azote

Comme attendu, la conductance stomatique du peuplier "peace" reste constante malgré des changements d'éclairement (figure 3.3A), ou de la fraction molaire de CO_2 (figure 3.3B), confortant ainsi les observations de Furukawa, *et al.*, 1990, Ridolfi et Dreyer, 1997, Ridolfi, *et al.*, 1996. Elle est restée également constante et en variant le VPD de l'air, aussi bien dans l'azote que dans l'hélium (figure 3.3C). Les rapports théoriques de diffusivité de la vapeur d'eau entre l'hélium et l'air, et entre l'hélium et l'azote sont respectivement de 2,33 et 3,49 (tableaux 3.1 et 3.4). L'ouverture stomatique est restée stable chez le peuplier "peace", et les rapports ont pu être estimés *in vivo* chez cette espèce. Les estimations sont inférieures de 15% (hélium/air) et 10% (hélium/azote) par rapport aux rapports théoriques (tableau 3.4).

III.3.4 Conductances au CO_2

III.3.4.1 : Trajet moyen du CO_2 dans les espaces gazeux du mésophylle, et conductance des espaces intercellulaires d'après le modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995

Le trajet moyen de diffusion du CO_2 dans le mésophylle (λ , tableau 3.5) est du même ordre de grandeur chez le peuplier et le rosier. Chez le laurier rose, il est environ deux fois plus élevé que chez le peuplier, mais n'est pas significativement différent de celui du rosier. Le chêne vert se distingue de toutes les autres espèces par un trajet plus long de 80 à 90%. Sur la base de λ , la conductance en phase gazeuse intercellulaire (g^{ias} calculée, tableau 3.5)

Figure 3.4 □ Courbes de réponse de A_n à C_{es} (symboles blancs) et C_c (symboles noirs) obtenus dans l'air (ronds) et dans l'hélox (losanges), pour le peuplier hybride peace, le rosier, et le laurier rose. L'éclairage de mesure est compris entre 450 et 600 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

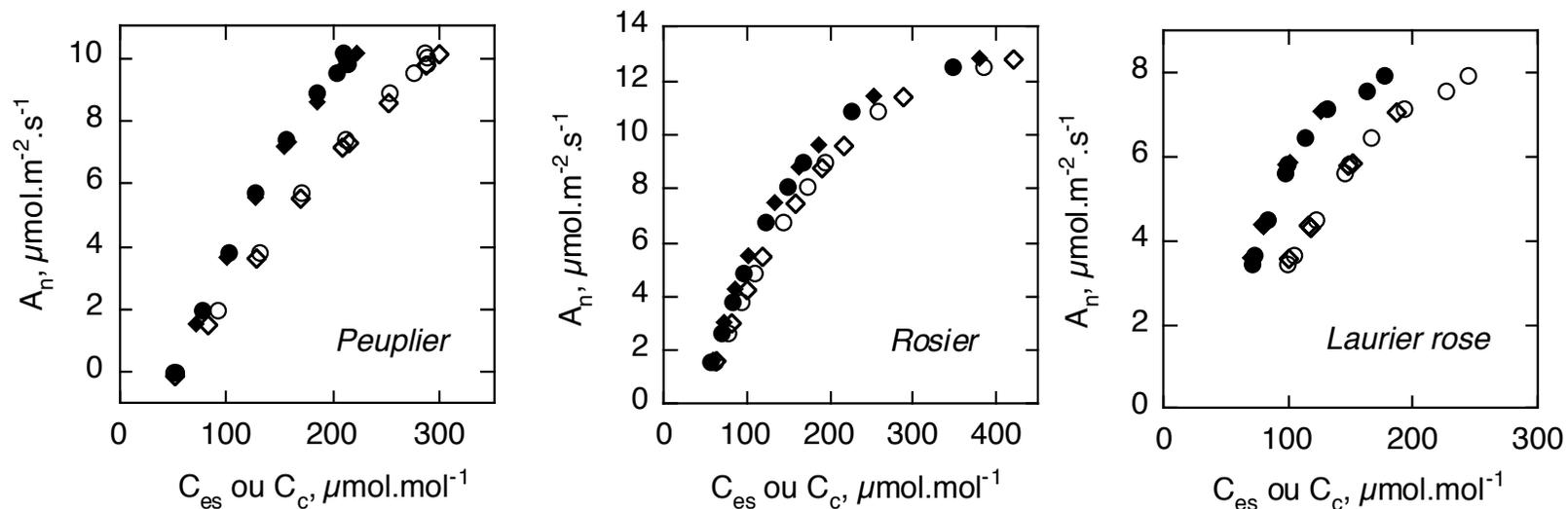


Figure 3.5 □ Courbes de réponse de A_n à C_{es} dans l'azote (carrés) et dans l'hélium (triangles) pour le peuplier hybride peace, le rosier et le laurier rose. Ces courbes ont été obtenues pour une feuille de chaque espèce, avec un éclairage variant entre 450 et 600 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

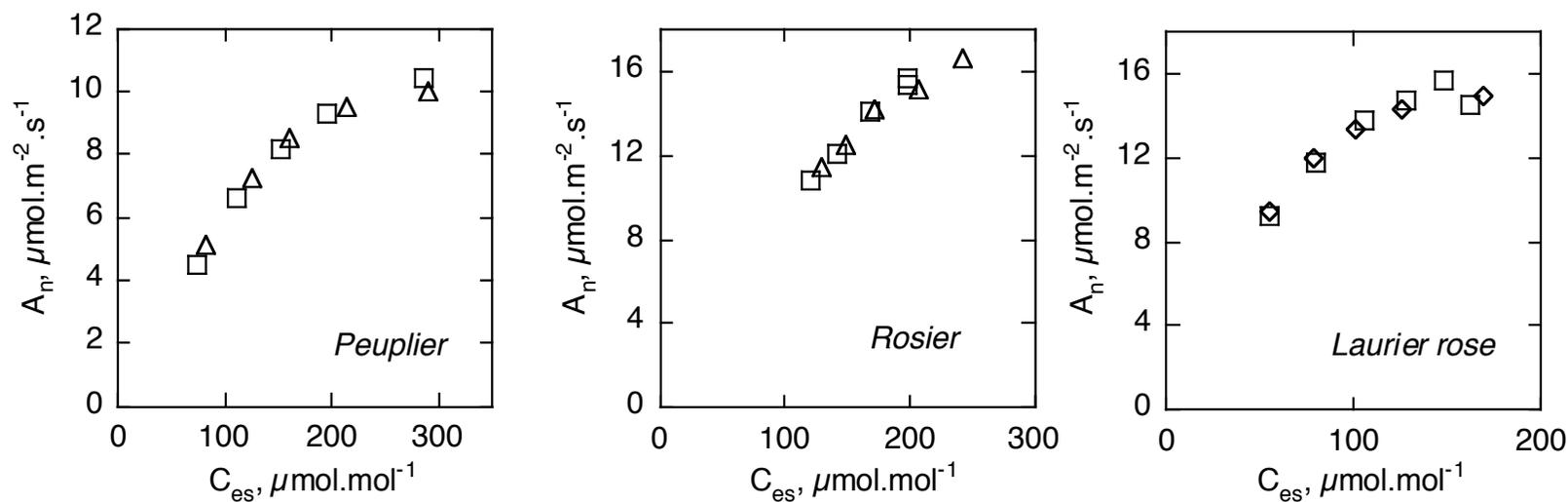


Tableau 3.4 Rapport théorique des diffusivités de la vapeur d'eau, et rapport des conductances stomatiques du peuplier peace dans les mélanges gazeux hélium/air et hélium/air. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1).

Mélanges gazeux	$D_{w,heiox}/D_{w,air}$ théorique	$D_{w,heiox}/D_{w,air}$ estimé	n
Hélium / Air	2.33	1.99 \pm 0.09	14
He / N ₂	3.49	3.14 \pm 0.41	15

Tableau 3.5 Trajet moyen du CO₂ dans le mésophylle (\square), et conductance dans les espaces intercellulaires (g^{ias}) calculée d'après le modèle de Syvertsen *et al.* (1995). Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\square=0.05$).

Espèce	\square mm	g^{ias} calculé mol.m ⁻² .s ⁻¹	n
Peuplier peace	0.53 \pm 0.08 ^a	1.17 \pm 0.16 ^a	5
Rosier	0.59 \pm 0.11 ^{ab}	1.07 \pm 0.20 ^a	3
Laurier rose	1.02 \pm 0.38 ^b	0.65 \pm 0.20 ^b	3
Chêne vert	4.92 \pm 2.42 ^c	0.15 \pm 0.06 ^c	4

Tableau 3.6 Assimilation nette (A_n) et conductance interne dans l'air (g_{air}^i) chez les espèces ne présentant pas d'effet de l'hélium. A_n a été mesurée pour un éclaircissement variant entre 450 et 600 μ mol photons.m⁻².s⁻¹ et $C_a=350 \mu$ mol.mol⁻¹. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\square=0.05$).

Espèce	A_n μ mol.m ⁻² .s ⁻¹	g_{air}^i mol.m ⁻² .s ⁻¹	n
Peuplier peace	8.2 \pm 1.1 ^a	0.211 \pm 0.036 ^a	9
Rosier	10.9 \pm 0.3 ^b	0.339 \pm 0.035 ^b	5
Laurier rose	nd	0.144 \pm 0.024 ^c	3

calculée à l'aide du modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995 prédit une g^{ias} élevée (supérieure à $0,5 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) chez le peuplier, le rosier et le laurier rose. Seul le chêne vert se distingue par une g^{ias} prédite faible ($0,15 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

III.3.4.2 : Effet de l'hélox sur la conductance interne, et conductances dans les espaces intercellulaires et en phase liquide

La figure 3.4 montre que les relations A_n vs C_{es} ne diffèrent pas dans l'air et dans l'hélox chez le peuplier, le rosier et le laurier rose. Connaissant la conductance interne de chacune des feuilles, les relations A_n vs C_c ont été calculées, et ne diffèrent pas non plus entre air et hélox. La figure 3.5 nous montre que pour ces mêmes espèces, les relations A_n vs C_{es} ne diffèrent pas entre l'azote et l'hélium (nb en conditions non photorespiratoires, ni C_c , ni la conductance interne ne peuvent être déterminées). Chez ces trois espèces, la conductance interne moyenne (tableau 3.6) s'échelonne entre $0,14$ et $0,34 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectivement pour le laurier rose et le rosier, le peuplier ayant une conductance interne intermédiaire ($0,21 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). L'absence d'effet de l'hélox sur les relations A_n vs C_{es} implique qu'il n'est pas possible de déterminer chez ces espèces les conductances en phase gazeuse intercellulaire (g^{ias}).

La figure 3.6 montre que le chêne vert se distingue des autres espèces par un effet de l'hélox sur la relation A_n vs C_{es} (ainsi, pour une même C_{es} , l'assimilation est plus élevée dans l'hélox que dans l'air). Par contre, la relation A_n vs C_c n'est pas affectée par la modification du mélange gazeux. La conductance interne du chêne vert est faible (tableau 3.7), et est très proche de celle déterminée chez le laurier rose. Le passage de l'air vers l'hélox augmente significativement la conductance interne (d'environ 20%), ce qui permet l'estimation des conductances en phase gazeuse intercellulaire (g^{ias}) et en phase liquide cellulaire (g^{liq}). Par souci de clarté, ces conductances ont été exprimées sous la forme de résistances, en pourcentage de la résistance interne. Ainsi, les résistances en phase gazeuse intercellulaire et en phase liquide cellulaire représentent respectivement environ 1/3 et 2/3 de la résistance interne chez le chêne vert.

Figure 3.6 Courbe de réponse de A_n à C_{es} (symboles blancs) et à C_c (symboles noirs) dans l'air (ronds) et dans l'hélox (losanges), obtenue chez le chêne vert. Les lignes sont des régressions d'ordre 2. Les conditions de mesures sont les même que pour la figure 3.4.

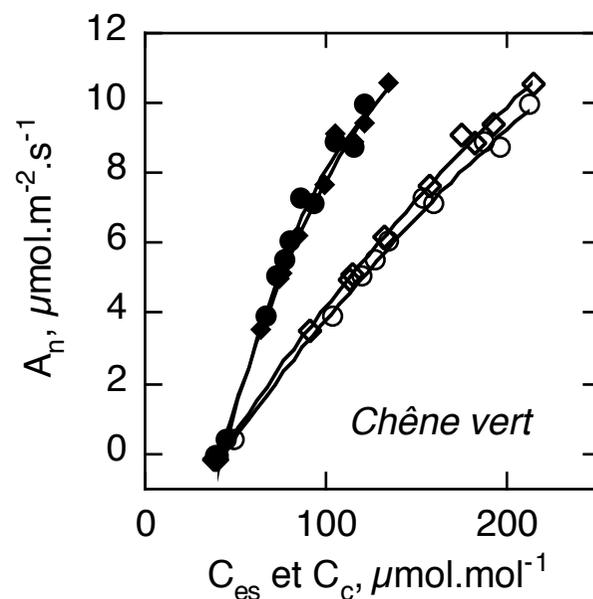


Tableau 3.7 Conductances internes dans l'air (g_{air}^i) et dans l'hélox (g_{helox}^i), conductances en phase gazeuse intercellulaire (g^{ias}) et liquide cellulaire (g^{liq}), et résistance en phase gazeuse (r^{ias}) et liquide (r^{liq}), estimées chez le chêne vert. Les résistances sont exprimées en pourcentage de la résistance en phase liquide. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student apparié, $\alpha=0.05$).

Espèce	g_{air}^i mol.m ⁻² .s ⁻¹	g_{helox}^i mol.m ⁻² .s ⁻¹	g^{ias} mol.m ⁻² .s ⁻¹	g^{liq} mol.m ⁻² .s ⁻¹	r^{ias} en % de r^i	r^{liq} en % de r^i	n
Chêne vert	0.118±0.017 ^a	0.145±0.024 ^b	0.368±0.035	0.176±0.033	32.2±3.7	67.8±3.7	3

III.4 Discussion

III.4.1 : Comportement stomatique sous atmosphère à base d'hélium

L'influence de l'hélium sur les échanges gazeux est dans tous les cas réversible. Nous considérerons comme Parkhurst et Mott, 1990 que l'hélium n'agit sur la photosynthèse foliaire qu'en facilitant la diffusion du CO₂, et qu'il n'entraîne pas d'autres modifications du fonctionnement photosynthétique de la feuille. Chez le rosier, le laurier rose et le chêne vert, l'hélox entraîne une diminution de l'ouverture stomatique, sauf si l'expérimentation est réalisée de manière à maintenir une transpiration constante dans tous les mélanges gazeux (données non présentées). Conformément à ce qui avait été observé par Mott et Parkhurst, 1991, c'est l'augmentation de la transpiration induite par l'hélox qui provoque cette réaction stomatique. D'autre part, nous confirmons le comportement stomatique inhabituel du peuplier hybride «Peace», (Furukawa, *et al.*, 1990, Ridolfi et Dreyer, 1997, Ridolfi, *et al.*, 1996), qui se distingue des autres espèces utilisées par une absence de régulation stomatique en réponse au CO₂, à l'éclairement et au VPD_i. Une faible réponse stomatique a toutefois été observée chez de jeunes peupliers "peace" préalablement exposés à un stress hydrique (données non présentées, et Ridolfi, *et al.*, 1996).

III.4.2 : Diffusivités théoriques et *in vivo*

Le peuplier "peace", dont l'ouverture stomatique ne varie pas, autorise une mesure simple et *in vivo* du rapport des diffusivités entre les différents mélanges gazeux. Les rapports de diffusivités ainsi estimés chez cette plante modèle sont significativement plus faibles de 10% (hélox/air) et 15% (hélium/azote) que les rapports théoriques. Parkhurst et Mott, 1990 ont également constaté un écart identique au notre pour les mélanges hélox/air chez une feuille d'*Ambrosia cordifolia*. Ces auteurs ont également réalisé une expérimentation analogue sur une feuille artificielle (surface transpirante recouverte d'une plaque métallique percée de trous simulant des stomates), et ont trouvé un ratio très proche du ratio théorique, ce qui permet d'éliminer l'hypothèse d'un mauvais étalonnage des analyseurs. Une hypothèse avancée par Parkhurst et Mott, 1990 pour expliquer le plus faible ratio estimé *in vivo* est que la vapeur d'eau ne diffuse plus uniquement par diffusion libre, et que l'interaction (collision) des molécules de vapeur d'eau avec les parois du pore stomatique ne peut plus être négligée

(diffusion dite de Knudsen, *cf.* Leuning, 1983 et Egorov et Karpushkin, 1988). Egorov et Karpushkin, 1988 ont calculé que la diffusion de Knudsen affecte significativement le ratio de diffusivités lorsque le pore stomatique a un très faible diamètre (inférieur à $3\mu\text{m}$). Dans le cas de notre peuplier, le pore stomatique a une longueur de l'ordre de 15 à $20\mu\text{m}$, pour une largeur d'environ 4 à $5\mu\text{m}$ (Furukawa, *et al.*, 1990). Par conséquent, l'effet de la diffusion de Knudsen par le pore stomatique est probablement faible. Parkhurst et Mott, 1990 ont également postulé que la forte augmentation de la transpiration lors du passage de l'air vers l'hélox, fait que l'eau transpirée provient de parois situées plus profondément dans le mésophylle que la cavité sous stomatique, pouvant ainsi rajouter une résistance en phase gaz intercellulaire à la résistance stomatique, ce qui diminuerait le rapport des conductances. Toutefois, contrairement à Parkhurst et Mott, 1990, nous avons maintenu lors de nos expérimentations une transpiration très proche dans l'air et l'hélox, ce qui permet d'écarter cette hypothèse.

Les rapports de diffusivités estimés sont ceux pour la vapeur d'eau, et les rapports de diffusivités pour le CO_2 (nécessaires au calcul de g^{ias} et g^{liq}) ne peuvent pas être estimés expérimentalement *in vivo*. La diffusion de Knudsen peut théoriquement se produire pour le CO_2 dans les réseaux d'espaces gazeux intercellulaires du mésophylle, et tout particulièrement dans le parenchyme palissadique qui possède généralement des espaces gazeux de très petite taille, et par conséquent affecter le rapport des diffusivités du CO_2 . Ainsi, le rapport des diffusivités pour le CO_2 n'est probablement pas affecté de la même manière que celui pour l'eau. Toutefois, les conséquences d'une éventuelle erreur modérée (10 à 15%) sur ce rapport restent faible, et nous utiliserons donc le rapport théorique pour calculer la conductance en phase gazeuse.

III.4.3 : Validité du couplage échanges gazeux / fluorescence chlorophyllienne dans l'air et dans l'hélox

Les échanges gazeux mesurent des échanges de CO_2 de chloroplastes situés dans l'ensemble du mésophylle, tandis que la fluorescence chlorophyllienne provient des assises supérieures du mésophylle (*cf.* chapitre II). L'absence de différence pour une expérimentation donnée entre l'étalonnage \square_{PSII} vs \square_e dans l'azote et celui dans l'hélium nous montre que les mesures combinées d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne dans les mélanges gazeux à base d'hélium et d'azote peuvent être directement comparées. D'autre part, la

linéarité et l'ordonnée à l'origine proche de zéro de la relation $\square_{\text{PSII}} \text{ vs } \square_e$, conforte les observations de Genty, *et al.*, 1989 (*cf.* chapitre II).

III.4.4 : Conductance des espaces gazeux intercellulaires

L'absence d'influence de l'hélox sur les courbes de réponse de A_n à C_{es} chez le peuplier, le rosier et le laurier rose indique que chez ces espèces, la conductance interne est sous la dépendance uniquement de sa composante en phase liquide cellulaire (*i.e.* $g^i = g^{\text{liq}}$). L'absence d'effet de l'hélium pur sur la relation A_n vs C_{es} (lequel permet d'augmenter la diffusivité de 3,5 fois par rapport à l'azote ou l'air, contre 2,3 fois pour l'hélox) confirme l'absence de composante gazeuse de la conductance interne chez ces trois espèces. Par contre, chez le chêne vert, la courbe de réponse de A_n à C_{es} est affectée par l'hélox. Ainsi, pour un même C_{es} , l'assimilation est plus élevée dans l'hélox que dans l'air, ce qui révèle que la conductance interne a chez cette espèce une composante gazeuse intercellulaire. Malgré cela, la conductance en phase gazeuse ne représente chez cette espèce qu'une composante minoritaire de la résistance interne (environ 30%). Ainsi, chez toutes les espèces étudiées, la conductance en phase liquide cellulaire représente la composante principale de la conductance interne.

Les principales caractéristiques anatomiques identifiées comme susceptibles d'influer sur la conductance en phase gazeuse sont (i) la répartition des stomates, (ii) l'épaisseur du mésophylle et (iii) la proportion d'espaces gazeux dans les tissus (*cf.* chapitre I). Le peuplier hybride « \square_{peace} » possède des stomates sur sa face adaxiale (avec une densité beaucoup plus faible que sur la face abaxiale), ce qui autorise pour partie seulement un trajet de diffusion du CO_2 plus court vers le parenchyme palissadique, où il est majoritairement assimilé. D'autre part, il possède un parenchyme lacuneux lâche et non cloisonné, favorisant la diffusion du CO_2 sur le plan paradermal, ainsi qu'une très forte proportion d'espaces gazeux dans son mésophylle. Ces caractéristiques sont donc susceptibles de favoriser une conductance intercellulaire élevée, conformément à ce qui a été observé grâce à la méthode reposant sur l'hélox. Les calculs effectués grâce au modèle de Syvertsen *et al.* prédisent également une conductance intercellulaire très élevée. Par contre, le rosier est strictement hypostome et hétérobarique, ce qui favorise théoriquement une conductance intercellulaire faible, contrairement à ce qui a été observé avec l'hélox. L'effet de ces deux caractéristiques anatomiques est probablement contrebalancé par le fait que son mésophylle est très peu épais, ce qui a pour conséquence un trajet de diffusion du CO_2 court. Cette hypothèse est renforcée

par les calculs effectués grâce au modèle de Syvertsen *et al.* qui prédisent une conductance intercellulaire très élevée. Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'absence d'effet de l'hélox chez le rosier pourrait être la forte conductance interne du rosier □ une faible augmentation de la conductance interne en hélox ne provoquerait qu'une faible augmentation de l'assimilation, laquelle pourrait être en deçà des limites de détection de notre dispositif d'échanges gazeux. Pour sa part, le laurier rose est strictement hypostome avec un mésophylle hétérobarique et une épaisseur foliaire très élevée. De plus, la fraction de volume d'espaces gazeux est très probablement surestimée chez cette espèce à cause de la présence de cryptes (qui peuvent se remplir d'eau, et ainsi fausser le calcul). Ainsi, toutes les conditions nécessaires à une conductance intercellulaire faible paraissent donc réunies chez cette espèce. Le calcul effectué grâce au modèle de Syvertsen *et al.* prédit une conductance en phase gazeuse élevée, mais est probablement surestimée (car le calcul repose sur une mesure précise de f^{ias} , qui est probablement faussé par les cryptes). Malgré cela, aucune contribution de la conductance intercellulaire n'a pu être mise en évidence par l'hélox et l'hélium. Une hypothèse serait que les invaginations de l'épiderme inférieur que sont les cryptes pourraient avoir pour effet de diminuer le trajet de diffusion du CO_2 dans le parenchyme lacuneux, et par conséquent de réduire la conductance intercellulaire. La quatrième espèce étudiée, le chêne vert, est strictement hypostome, hétérobarique, avec un mésophylle très épais et particulièrement compact avec une très faible proportion d'espaces gazeux. Ces caractéristiques anatomiques peuvent effectivement être à l'origine de la faible conductance en phase gaz estimée grâce à l'expérimentation en hélox. De plus, l'estimation de la conductance en phase gaz calculée grâce au modèle de Syvertsen *et al.* est très proche de celle estimée expérimentalement.

Parkhurst et Mott, 1990, grâce à un système d'échanges gazeux utilisant de l'hélox, ont montré un effet de l'hélox sur l'assimilation nette de CO_2 chez les ligneux hypostomes, ce qui n'a pas été observé dans notre cas, en particulier chez le laurier rose où toutes les conditions semblent réunies pour induire une faible g^{ias} . Ces auteurs rapportent une assimilation 13% plus élevée en hélox que dans l'air chez le laurier rose, tandis qu'aucun effet de l'hélox n'a été observé dans notre cas. L'absence de données anatomiques dans leur étude ne nous permet pas d'effectuer des comparaisons avec nos résultats. D'autre part, leur travail se limite à une analyse qualitative, puisqu'ils n'étaient pas en mesure de quantifier les conductances interne et intercellulaire chez les espèces où ils observent un effet de l'hélox.

Par contre, notre travail expérimental est cohérent avec le travail de modélisation effectué par Syvertsen, *et al.*, 1995. A partir d'un jeu de données expérimentales obtenues chez quatre

ligneux hypostomes (estimation de la conductance interne par la discrimination du $^{13}\text{CO}_2$, et quantifications anatomiques), ces auteurs ont proposé un modèle simple en une dimension permettant de dissocier les deux composantes de la résistance interne. Leur modèle suppose que la résistance en phase gaz est liée à la “tortuosité” du trajet gazeux (cf. Ball, 1981) dans les espaces intercellulaires, et que la résistance en phase liquide est liée à la densité des tissus du mésophylle et à la surface de chloroplaste exposée aux espaces intercellulaires. Les résultats de leur modèle suggèrent que la résistance en phase liquide est la principale composante de la résistance interne, et cela même chez les feuilles hypostomes les plus épaisses. Ces résultats sont renforcés par un autre travail de modélisation, réalisé par Terashima, *et al.*, 2001 grâce à un modèle en une dimension, qui suggère que chez les espèces présentant une faible résistance interne, la résistance en phase liquide est largement supérieure à celle en phase gaz. Leurs simulations prévoient également que la majeure partie des variations de résistance interne résultent de variations de résistance en phase liquide.

III.4.5 : Origine de la conductance en phase liquide

Nos résultats indiquent que la conductance interne se trouve majoritairement dans la phase liquide cellulaire. Les particularités cellulaires expliquant les variations intra ou interspécifiques de la conductance en phase liquide restent toutefois très mal connues. En dehors de la phase liquide elle-même (où la diffusion du CO_2 est beaucoup plus difficile que dans l'air), la conductance en phase liquide est affectée par la surface cumulée de chloroplastes exposée aux espaces intercellulaires. Ainsi, pour une perméabilité au CO_2 donnée des constituants cellulaires, plus la surface de chloroplaste exposée aux espaces gazeux intercellulaires est grande, et plus la conductance en phase liquide est faible. Les autres facteurs pouvant influencer la conductance en phase liquide sont la longueur du trajet de diffusion, l'épaisseur et la composition de la paroi, et les perméabilités au CO_2 des constituants cellulaires. Les membranes en l'absence de canaux ou de transporteurs sont très fortement imperméables au CO_2 (cf. chapitre I). Ces perméabilités au CO_2 des constituants cellulaires sont extrêmement difficiles à estimer. Ainsi, les perméabilités des membranes biologiques sont hautement variables selon les études (Gimmler, *et al.*, 1990, Gutknecht, *et al.*, 1977, Stadelmann, 1977, Sültemeyer et Rinast, 1996). Des calculs de conductance au CO_2 en phase liquide cellulaire effectués sur la base de coefficients de perméabilité théoriques ont été effectués par Nobel, 1991 et Evans, *et al.*, 1994, mais sont très peu fiables car fortement

dépendantes des valeurs attribuées aux perméabilités membranaires. La présence de systèmes de concentration du CO₂, de transporteurs ou de canaux membranaires facilitant la diffusion du CO₂ n'a à l'heure actuelle jamais été mise en évidence chez des végétaux de type C3. Des travaux récents ont toutefois mis en évidence dans le génome du tabac un gène analogue à un gène impliqué dans un mécanisme de transfert actif de CO₂ chez une algue (*cf.* Joyard *et al.*, 1998 et références citées). Des travaux sont en cours pour déterminer si le fait de supprimer l'expression ce gène influence la diffusion du CO₂ chez le tabac (Genty *et al.*, communication personnelle).

D'autre part, il a été fréquemment postulé que l'anhydrase carbonique présente dans le chloroplaste pourrait avoir un rôle de facilitation de la diffusion dans le stroma (*cf.* chapitre I). Cette enzyme catalysant l'interconversion du CO₂ et de l'HCO₃⁻, est une des protéines foliaires parmi les plus abondantes, et est localisée majoritairement dans le chloroplaste, soit sous forme libre, soit liée aux membranes photosynthétiques (Moroney, *et al.*, 2001 et références citées). D'autres isoformes ont cependant été localisées dans d'autres compartiments cellulaires comme le cytosol (Rumeau, *et al.*, 1996), ainsi que liées à la membrane plasmique (*cf.* Moroney, *et al.*, 2001). Afin de tester l'hypothèse de facilitation de la diffusion du CO₂ par l'anhydrase, Price, *et al.*, 1994 ont comparé les échanges gazeux d'un tabac transgénique sans activité anhydrase, avec un tabac sauvage témoin. Leurs travaux ne montrent qu'un très faible effet de facilitation par l'activité anhydrase. Peltier, *et al.*, 1995 ont inhibé *in vivo* l'activité anhydrase foliaire de *Commelina communis* grâce à un inhibiteur chimique (ethoxyzolamide). Leurs expérimentations montrent qu'une inhibition de 92 à 95% de l'activité anhydrase n'a pas d'effet sur l'assimilation et la fraction molaire de CO₂ aux sites enzymatiques (C_c). Toutefois il a été montré que le tabac est une herbacée possédant une conductance interne élevée (*cf.* Evans et Loreto, 2000), et il en est probablement de même chez l'herbacée *Commelina communis*. Cette hypothèse de facilitation doit être testée chez des végétaux ayant une faible conductance interne, et en particulier chez des ligneux. Gillon et Yakir, 2000 ont proposé une approche expérimentale reposant sur la discrimination contre le C¹⁸O₂ pendant la photosynthèse. Un modèle leur permet de distinguer la fraction molaire de CO₂ aux sites de carboxylation de la Rubisco (C_c), de celle à la limite physique de l'activité anhydrase (C_{chloro}, considérée par ces derniers comme la surface du chloroplaste). Ces auteurs considèrent a priori que la conductance interne est uniquement occasionnée par la phase liquide cellulaire, et connaissant C_c et C_{chloro}, peuvent par conséquent dissocier la conductance interne en une conductance de la paroi (g^{paroi}) et une conductance dans le chloroplaste (g^{chloro}). Des mesures ont été effectuées chez deux herbacées (le tabac et le soja) ayant une

conductance interne élevée (entre 0.3 et 0.5 mol.m⁻².s⁻¹) associée à une faible activité anhydrase, et chez le chêne (*Quercus robur*), lequel possède une conductance interne faible (0.27 mol.m⁻².s⁻¹) et une très forte activité anhydrase (environ 3 à 6 fois celle des deux autres espèces). Leurs résultats suggèrent que plus l'activité anhydrase est importante, et plus g^{chloro} est élevée. Ces auteurs émettent ainsi la théorie qu'une forte activité anhydrase permettrait de en partie de compenser une faible conductance au CO₂ de la paroi cellulaire chez les ligneux, en augmentant la conductance au CO₂ dans le chloroplaste. Toutefois, il est important de noter que les conclusions de Gillon et Yakir, 2000 peuvent être faussées si il existe une activité anhydrase à l'extérieur du chloroplaste, et en particulier dans la paroi : leur C_{chloro} dans ce cas ne correspondrait plus à une fraction molaire de CO₂ dans le chloroplaste, mais serait localisé à proximité des espaces gazeux intercellulaires et de la paroi (ce qui expliquerait qu'il soit très proche de C_{es}).

Des expérimentations préliminaires réalisées chez le peuplier "peace" (Genty, Piel *et al.*, données non présentées), suggèrent qu'environ 95% d'inhibition *in vivo* de l'activité anhydrase chez le peuplier "peace" n'affecte pas significativement l'assimilation nette de CO₂. Ainsi, chez cette espèce ayant une faible g^{liq} et une forte activité anhydrase, la facilitation de la diffusion du CO₂ dans le chloroplaste par l'anhydrase carbonique n'aurait qu'une influence très mineure sur la conductance en phase liquide. Ces premiers résultats tendent ainsi à contredire la théorie de Gillon et Yakir, 2000 décrite précédemment. D'autres expérimentations préliminaires (Genty *et al.*, résultats non présentés) suggèrent également que la conductance interne du peuplier "Peace" n'est pas affectée par 95% d'inhibition *in vivo* de l'activité anhydrase carbonique, et tendent ainsi à confirmer que la facilitation de la diffusion du CO₂ par l'anhydrase est probablement très faible.

III.5 Conclusion

Chez les quatre espèces étudiées, nous avons montré que la majorité, voire la totalité, de la conductance interne est déterminée par la diffusion du CO₂ dans la phase liquide cellulaire. Seul le chêne vert présente une contribution (minoritaire) de la diffusion dans les espaces gazeux intercellulaire. Toutefois, le lien entre anatomie du mésophylle et diffusion du CO₂ est très complexe. Les caractéristiques anatomiques associées à une faible g^{ias} sont dans notre étude une très faible fraction de volume d'espaces gazeux intercellulaires, et une forte densité de tissus dans le mésophylle. Contrairement aux observations de Parkhurst et Mott, 1990, nous

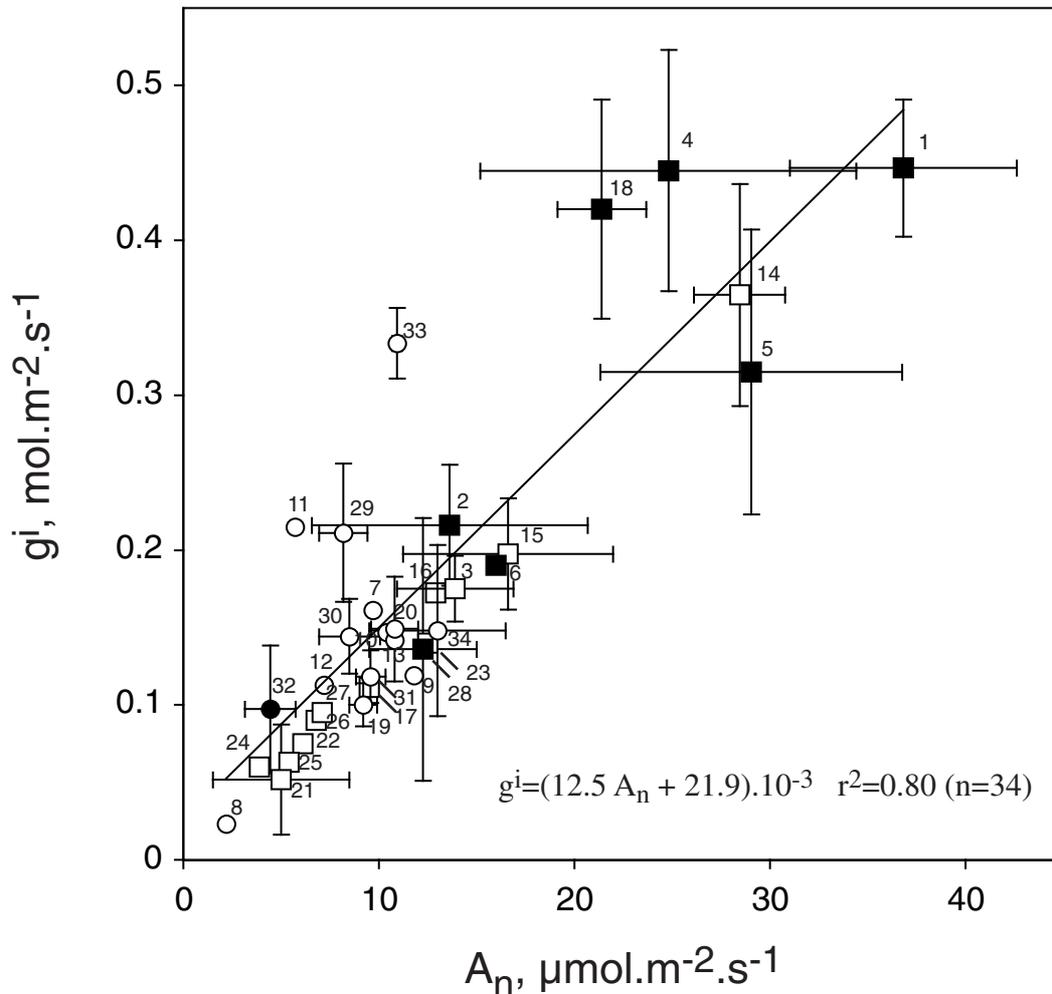
montrons que la répartition des stomates ne semble pas être le principal facteur déterminant une faible g^{ias} . Il ne nous a toutefois pas été possible de comprendre pourquoi une contribution en phase gazeuse est observée chez le chêne vert, et pas chez le laurier rose, qui a pourtant des caractéristiques anatomiques proches. De la même manière que des modèles en trois dimensions décrivant explicitement l'anatomie du mésophylle ont pu être utilisés avec succès pour comprendre le lien entre anatomie et absorption de la lumière (*e.g.* Ustin, *et al.*, 2001), une approche similaire par modélisation en trois dimensions de la diffusion dans la feuille pourrait être envisagée pour comprendre les liens entre anatomie du mésophylle et la diffusion du CO_2 .

Les facteurs influençant la conductance en phase liquide cellulaire restent à l'heure actuelle très mal connus. Les données préliminaires obtenues en inhibant *in vivo* l'activité anhydrase carbonique suggèrent toutefois que le rôle de facilitation de la diffusion du CO_2 par l'anhydrase est très faible. De futures investigations seront nécessaires pour confirmer ces données, ainsi que de déterminer si la variabilité de la conductance en phase liquide est uniquement liée à l'ultrastructure cellulaire (composition et épaisseur de la paroi et des membranes, etc.), ou si des mécanismes biochimiques actifs sont impliqués. Des tels travaux ont été récemment initiés au CEA-Cadarache (Genty *et al.*, communication personnelle).

CHAPITRE IV

Variabilité de la conductance interne

Figure 4.1 : Relation entre la conductance interne (g^i) et l'assimilation nette à fort éclaircissement (A_n). Les estimations effectuées chez des herbacées sont distinguées par des symboles pleins, et celles chez des ligneux par des symboles vides. Les carrés représentent les données obtenues par la technique de Evans *et al.*, 1986, et les ronds les données obtenues par celle de Harley *et al.*, 1992. Les chiffres permettent d'identifier l'auteur de l'expérimentation et l'espèce (*cf.* tableau en bas de page). Les données obtenues par la méthode de Harley *et al.*, 1992, et où $g^i > 0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ont été supprimées, à l'exception des données obtenues chez le rosier pendant cette thèse.



Auteur	Especies
Von Caemmerer <i>et al.</i> , 1991	<i>Triticum aestivum</i> (1), <i>Phaseolus vulgaris</i> (2), <i>Eucalyptus blakely</i> (3), <i>Oryza sativa</i> (4), <i>Raphanus sativus</i> (5), <i>Nicotiana tabacum</i> (6)
Loreto <i>et al.</i> , 1992	<i>Arbutus unedo</i> (7), <i>Citrus aurantium</i> (8), <i>Eucalyptus globulus</i> (9), <i>Hedera helix</i> (10), <i>Nerium oleander</i> (11), <i>Quercus ilex</i> (12), <i>Quercus rubra</i> (13)
Lloyd <i>et al.</i> , 1992	<i>Prunus persica</i> (14), <i>Citrus paradisi</i> (15), <i>Citrus lemon</i> (16), <i>Macadamia intergrifolia</i> (17)
Evans <i>et al.</i> , 1994	<i>Nicotiana tabacum</i> (18)
Epron <i>et al.</i> , 1995	<i>Fagus sylvatica</i> (19), <i>Castanea sativa</i> (20)
Lauteri <i>et al.</i> , 1997	<i>Castanea sativa</i> (21)
Hanba <i>et al.</i> , 1999	<i>Quercus glauca</i> (22), <i>Quercus phillyraeoides</i> (23), <i>Cinnamomun camphora</i> (24), <i>Castanopsis sieboldi</i> (25), <i>Ligustrum licidum</i> (26), <i>Camelia japonica</i> (27)
Kogami <i>et al.</i> , 2001	<i>Polygonum cuspidatum</i> (28)
Cette étude	<i>Populus trichocarpa x koreana</i> cv peace (29), <i>Nerium oleander</i> (30), <i>Quercus ilex</i> (31), <i>Lamium galeobdolon</i> (32), <i>Rosa rubiginosa</i> (33), <i>Juglans regia x nigra</i> (34)

IV.1 : Introduction

Depuis l'apparition des premières techniques fiables permettant d'estimer g^i , la majorité des travaux se sont penchés sur sa variabilité interspécifique, laquelle est de mieux en mieux documentée. Ces études ont montré que g^i varie globalement entre 0.05 et 0.5 mol.m⁻².s⁻¹ et est généralement du même ordre de grandeur que la conductance stomatique maximale au CO₂ (Badeck, *et al.*, 1997, Evans et Loreto, 2000). La conductance interne se distingue de la conductance stomatique par son absence de variation pendant la journée, et plus généralement sur des pas de temps supérieur à la semaine. Une corrélation positive a été trouvée entre g^i et l'assimilation nette maximale (*cf.* Evans et Loreto, 2000), et les espèces ligneuses semblent se distinguer des espèces herbacées par une plus faible assimilation nette maximale (A_n^{\max}) et une plus faible g^i .

Contrairement à la variabilité entre espèces, la variabilité phénotypique de g^i n'a été que très peu étudiée. Elle est affectée par un traitement lumineux $\square g^i$ est ainsi plus faible chez un végétal qui s'est développé sous un plus faible éclaircissement (Evans, *et al.*, 1994, Lloyd, *et al.*, 1992). g^i tend à décroître avec l'âge des feuilles (Loreto, *et al.*, 1994, Scartazza, *et al.*, 1998). Elle diminue également sous l'effet d'une sécheresse (Lauteri, *et al.*, 1997) et sous l'effet d'un stress salin (Delfine, *et al.*, 1999, Delfine, *et al.*, 1998).

L'objectif de ce chapitre sera (i) de faire le point sur les différences interspécifiques de g^i ainsi que de tester l'hypothèse d'une différence entre espèces ligneuses et herbacées, et (ii) de documenter la variabilité de g^i au sein d'une espèce (le noyer) en réponse à l'éclaircissement et à un enrichissement en CO₂.

IV.2 : Variabilité interspécifique

IV.2.1 \square Introduction

Une compilation des principales données disponibles sur la diversité interspécifique de g^i (*cf.* figure 4.1, ainsi que Evans et Loreto, 2000, montre que la conductance interne est très variable. La revue d'Evans et Loreto, 2000 suggère l'existence d'une corrélation positive entre g^i et A_n^{\max} . La plupart des travaux réalisés chez des espèces ligneuses révèlent une g^i comprise entre 0.02 et 0.2 mol.m⁻².s⁻¹ pour une A_n^{\max} dans la gamme 2 à 20 μ mol.m⁻².s⁻¹, tandis

que la majorité des ceux réalisés chez des herbacées révèlent une g^i généralement comprise entre 0.2 et 0.5 mol.m⁻².s⁻¹ pour une A_n^{\max} entre 10 et 40 μmol.m⁻².s⁻¹. Ces résultats suggèrent que les espèces ligneuses se distinguent des espèces herbacées par une plus faible conductance interne, et il a également été émis l'hypothèse que cette plus faible g^i pourrait être une des causes de la plus faible A_n^{\max} classiquement rencontrée chez les ligneux par rapport aux herbacées (Lloyd, *et al.*, 1992, Epron, *et al.*, 1995, Badeck, *et al.*, 1997). La plus faible g^i des ligneux peut théoriquement résulter (i) de différences de l'organisation du mésophylle résultant en une faible conductance en phase gazeuse intercellulaire, ainsi que (ii) de différences de caractéristiques cellulaires (surface de chloroplastes exposée aux espaces gazeux intercellulaires, perméabilité de la paroi et des membranes au CO₂), aboutissant à une faible conductance en phase liquide. De plus en plus d'arguments suggèrent toutefois que la variabilité de g^i entre espèces est la résultante de différences de conductance en phase liquide cellulaire plutôt qu'en phase gazeuse intercellulaire (*cf.* discussion du chapitre III).

Il est toutefois important de noter que la majorité des études effectuées chez des herbacées ont été réalisées avec des espèces connues pour présenter de fortes assimilations maximales (tabac, épinard, blé, etc...), ce qui est susceptible de mettre en cause la pertinence de l'opposition entre ligneux et herbacées. Aussi, nous étudierons la conductance interne chez une herbacée de sous-bois, le lamier, connue pour posséder de très faibles A_n^{\max} et conductance stomatique. Enfin, nous ferons le bilan des données de cette thèse ainsi que celles des principales études disponibles dans la littérature.

IV.2.2 ☐ Matériels et méthodes

IV.2.2.1 : Matériel végétal

Le lamier (*Lamium galeobdolon*) cultivés en conditions contrôlées sous de très faibles éclairagements, simulant qualitativement et quantitativement l'éclairément d'un sous-bois. Des lamier, obtenus par bouturage à partir de plantes sauvages prélevées en forêt à Orsay, ont été cultivés sur un mélange de tourbe et de sable, et disposés dans une chambre climatisée (photopériode de 14 à 16 heures). L'environnement lumineux d'ombre a été simulé en interposant deux filtres (un filtre vert 421 et un filtre marron 207, Strand Filters) sous des lampes HQI 400w (Osram) et halogènes sous voltées. L'éclairément moyen au niveau des plantes inférieur à 100 μmol.m⁻².s⁻¹.

Tableau 4.1 Assimilation nette maximale (A_n^{\max}), conductance stomatique au CO_2 maximale (g_c^{\max}), conductance interne (g^i) épaisseur foliaire (L), masse surfacique (LMA), fraction de volume d'espaces gazeux intercellulaires foliaire (f^{ias}) et densité de tissus foliaire (T_d) chez le lamier d'ombre. L'assimilation nette a été mesurée sous un éclairement de $1500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1).

Espèce	A_n^{\max} $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g_c^{\max} $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g^i $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	L mm	LMA g.m^{-2}	f^{ias}	T_d g.m^{-3}	n
Lamier	4.1 \pm 1.3	0.045 \pm 0.023	0.097 \pm 0.041	0.16 \pm 0.03	24.7 \pm 4.7	0.21 \pm 0.01	197 \pm 41	4

Tableau 4.2 Récapitulatif des assimilations nettes à fort éclairement (A_n), conductances internes (g^i), épaisseurs foliaires (L), masses surfaciques (LMA), fraction de volume d'espaces gazeux intercellulaires foliaire (f^{ias}) et densité de tissus foliaire (T_d) chez les ligneux étudiés durant cette thèse. L'assimilation nette a été mesurée sous un éclairement de 450 à 600 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ chez le peuplier, le rosier, le chêne vert et le laurier rose, et de 1500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ chez le noyer. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1).

Espèce	A_n $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g^i $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	L mm	LMA g.m^{-2}	f^{ias}	T_d g.m^{-3}	n
Peuplier "peace"	8.2 \pm 1.1	0.211 \pm 0.036	0.23 \pm 0.02 (n=5)	46.3 \pm 9.9 (n=5)	0.46 \pm 0.04 (n=5)	379 \pm 109 (n=5)	9
Rosier	10.9 \pm 0.25	0.339 \pm 0.035	0.12 \pm 0.02 (n=3)	37.4 \pm 4.1 (n=3)	0.27 \pm 0.01 (n=3)	442 \pm 45 (n=3)	5
Chêne vert	9.6 \pm 0.8	0.118 \pm 0.017	0.28 \pm 0.02	128.7 \pm 12.3	0.15 \pm 0.04	541 \pm 60	3
Laurier rose	8.5 \pm 1.6	0.144 \pm 0.024	0.31 \pm 0.02	95.2 \pm 8.1	0.30 \pm 0.06	438 \pm 28	3
Noyer (lumière)	15.8 \pm 1	0.192 \pm 0.039	0.15 \pm 0.01	62.1 \pm 5	0.17 \pm 0.02	502 \pm 99	12
Noyer (ombre)	9.1 \pm 1.4	0.086 \pm 0.016	0.10 \pm 0.01	33.4 \pm 2	0.23 \pm 0.02	392 \pm 4	12
Noyer (fort CO_2)	14.1 \pm 1	0.166 \pm 0.040	0.15 \pm 0.01	79.2 \pm 6.3	0.13 \pm 0.01	512 \pm 52	12

IV.2.2.2 : Estimation de l'assimilation nette maximale (A_n^{max}), la respiration à l'obscurité (R_{obs}), la conductance stomatique maximale (g_c^{smax}), et la conductance interne

Les échanges gazeux foliaires ont été étudiés à l'aide d'un dispositif portatif Licor 6400 (*cf.* Annexe I). Cet appareil a été équipé d'une "tête" permettant de coupler échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne (prototype n°1, *cf.* figure A1.4 de l'annexe I). La conductance interne a été estimée à l'aide du protocole à flux d'électrons constant (*cf.* description dans le chapitre II, et protocole dans l'annexe I). Le \square^* du lamier utilisé pour l'estimation de g^i est précisé dans le chapitre II. La respiration à la lumière (R_d) a été calculée à partir de R_{obs} et du pourcentage d'inhibition de la respiration à la lumière (donné dans le chapitre II).

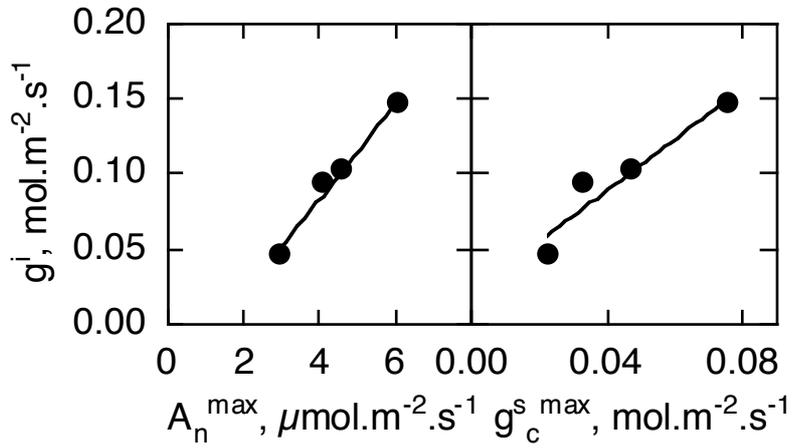
IV.2.3 □ Résultats et discussion

IV.2.3.1 : Caractérisation des échanges gazeux et de l'anatomie du lamier

Les A_n^{max} et g^i moyens du lamier sont très faibles (tableau 4.1) par comparaison avec ceux des espèces ligneuses déjà étudiées (tableau 4.2). Ces résultats montrent qu'à l'instar des ligneux, une herbacée à très faible assimilation présente également une très faible g^i . Chez cette espèce, g_c^{smax} est environ deux fois plus faible que g^i (tableau 4.1), et la principale limitation à la diffusion du CO_2 chez cette espèce est donc la diffusion par les stomates. A_n^{max} et g_c^{smax} sont tous deux positivement corrélés avec g^i (fig. 4.2). Cette herbacée possède également une faible épaisseur foliaire, proche de celle observée chez le rosier (*cf.* chapitre III) et le noyer (*cf.* §IV.3). La fraction de volume d'espaces gazeux foliaire est faible par comparaison avec d'autres espèces herbacées (*eg.* 30 à 40% chez le tabac, Evans, *et al.*, 1994), et est proche de celle rencontrée chez le chêne vert (*cf.* chapitre III) et le noyer (*cf.* §IV.3). Toutefois, étant donnée la faible épaisseur foliaire du lamier, la faible conductance interne chez cette espèce est selon toute vraisemblance due à une faible conductance en phase liquide sans contribution significative de la diffusion en phase gazeuse intercellulaire (*cf.* discussion du chapitre III).

Le LMA du lamier (tableau 4.1) est faible par rapport à celui estimé chez des ligneux (chapitre III, Syvertsen, *et al.*, 1995). La densité de tissus du mésophylle (tableau 4.1) est environ 2 à 4 fois plus faible que celle mesurée chez des ligneux (*cf.* chapitre III, ainsi que

Figure 4.2 Relations entre la conductance interne (g^i) et l'assimilation nette maximale (A_n^{\max}) et la conductance stomatique maximale au CO_2 ($g_c^{\text{s max}}$) chez le lamier d'ombre. A_n^{\max} et $g_c^{\text{s max}}$ ont été estimés sous un éclairage de $1000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. L'équation de la relation g^i vs. A_n^{\max} est : $g^i = (31.5 A_n^{\max} - 43.1).10^{-3}$, $r^2=0.98$.



Syvertsen, *et al.*, 1995). Le mésophylle du lamier est donc relativement compact, mais très peu dense. L'observation chez le lamier d'une très faible g^i associée à des faibles LMA et T_d contraste fortement avec les observations de Syvertsen, *et al.*, 1995, lesquels observent que plus LMA et T_d sont élevés, et plus g^i est faible. Ce résultat suggère (i) que les variations de g^i ne résultent pas de changements anatomiques tels que l'épaisseur de la paroi, laquelle est positivement corrélée avec T_d (Syvertsen, *et al.*, 1995), et (ii) que le LMA est un très mauvais estimateur des variations de g^i entre espèces.

IV.2.3.2 : Variabilité interspécifique de la relation entre g^i et A_n^{max}

Comme cela avait été montré par Evans et Loreto, 2000, la compilation des données obtenues par la méthode de Harley, *et al.*, 1992a et par celle de Evans, *et al.*, 1986 permet de mettre en évidence une corrélation positive entre g^i et A_n^{max} ($g^i = (14.3 A_n + 34.8).10^{-3}$, $r^2=0.54$, $n=37$, données non présentées). Harley, *et al.*, 1992a ont toutefois montré que la méthode couplant échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne fournit des estimations de g^i peu fiables lorsque g^i est supérieur à $0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (*cf.* également chapitre II). Evans et Loreto, 2000 ont ainsi proposé d'éliminer les données avec $g^i > 0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et utilisant cette technique, ce qui a pour effet d'améliorer sensiblement la corrélation A_n vs g^i ($g^i = (12.6 A_n + 19.3).10^{-3}$, $r^2=0.81$, $n=31$, fig. 4.1). D'autre part, nous avons montré que \square^* est variable entre les espèces, et l'absence de prise en compte de cette variabilité pour la détermination de g^i par la méthode de Harley, *et al.*, 1992a peut fausser considérablement les estimations de g^i . (*cf.* chapitre II). Ainsi, certaines données obtenues par la méthode de Harley, *et al.*, 1992a peuvent être potentiellement biaisées par l'utilisation d'un mauvais \square^* . Le fait que plus g^i est élevé, et plus son estimation est sensible à une erreur sur \square^* (chapitre II), nous conforte dans ce choix de ne pas prendre en compte les données avec $g^i > 0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. D'autre part, ce n'est pas toujours l'assimilation nette maximale qui est mesurée simultanément à g^i , mais dans beaucoup de cas l'assimilation à un éclairage fort mais non saturant. Ce problème est potentiellement une source de variabilité dans la corrélation A_n vs g^i . Il sera ainsi nécessaire de mesurer le véritable A_n^{max} dans les futures études consacrées à la conductance interne.

Nos données obtenues chez le peuplier hybride, le rosier, le chêne (*cf.* chapitre III) et le noyer (*cf.* §IV.3) se situent dans la gamme de celles déjà publiées chez des ligneux. Par contre, on trouve chez le lamier une g^i et une A_n^{max} particulièrement faibles pour une herbacée. En particulier, c'est chez cette espèce qu'a été mesurée la plus faible g^i rapportée chez une

herbacée (*cf.* fig. 4.2). Ce travail démontre clairement qu'une faible g^i n'est pas une propriété spécifique aux ligneux, résultant par exemple de la lignification de la paroi.

Comme l'avaient suggéré Evans et Loreto, 2000, une conséquence de la corrélation g^i vs A_n^{\max} est que le gradient de fraction molaire de CO_2 entre les espaces évaporants intercellulaires et les sites enzymatiques de la Rubisco ($C_{es} - C_c$, qui est égal au rapport A_n/g^i , *cf.* chapitre I) estimé à éclaircissement saturant ne varie que faiblement entre les espèces ($74 \pm 18 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ en moyenne, $n=31$, données non présentées). Nos données obtenues chez des ligneux et une herbacée d'ombre confortent cette observation. Cette faible variabilité du gradient $C_{es} - C_c$ entre espèces peut être interprétée comme une étroite coordination interspécifique entre conductance interne et capacité biochimique de carboxylation. Toutefois, les deux facteurs permettant de décrire cette capacité maximale de carboxylation, V_c^{\max} et J^{\max} , n'ont été que très rarement mesurés simultanément à g^i , et devons donc l'être dans les études ultérieures consacrées à g^i .

IV.2.4 Conclusion

Nos données obtenues chez le peuplier hybride, le rosier, le lamier, le chêne vert et le noyer se situent dans la gamme de celles déjà publiées chez des ligneux, mais celle obtenue chez le lamier d'ombre se distingue fortement de celles publiées chez d'autres herbacées. Le très faible nombre de travaux effectués sur des herbacées à faible capacité d'assimilation de CO_2 , et l'utilisation d'herbacées à forte assimilation et à forte g^i a mené à l'idée erronée qu'une faible g^i est une caractéristique spécifique aux espèces ligneuses. Nos résultats obtenus chez le lamier démontrent clairement que ce n'est pas le cas. Nos résultats suggèrent également que la variabilité interspécifique de g^i n'est pas liée à des caractéristiques anatomiques telles que l'épaisseur foliaire, la densité de tissus, ou le LMA.

La corrélation entre g^i et A_n^{\max} entre espèces semble particulièrement robuste, mais devra toutefois être complétée par d'autres mesures sur des herbacées à faible assimilation. De la même manière, très peu de travaux ont été réalisés sur des ligneux à forte assimilation. Les A_n^{\max} rapportées pour des ligneux dans la corrélation A_n^{\max} vs g^i sont en effet relativement faibles, et ne dépassent pas 20 à 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ceci peut s'expliquer par le fait que beaucoup de travaux (comme la plupart de ceux de cette thèse), ont été réalisés sur de jeunes ligneux cultivés en pots, lesquels sont connus pour présenter des assimilations plus faibles que des arbres adultes en conditions naturelles (Dreyer *et al.*, données non publiées). Ce choix de

travailler sur de jeunes arbres est souvent une contrainte liée à l'utilisation de la technique de Evans, *et al.*, 1986, laquelle est particulièrement lourde et requiert le plus souvent de travailler en laboratoire, ou dans notre cas de l'utilisation de la technique utilisant l'hélox, très lourde également. Etant donné que la technique associant échange gazeux et fluorescence n'est pas utilisable de manière fiable pour des $g^i > 0.3 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ce qui est probablement le cas lorsque l'assimilation maximale est élevée), des développements méthodologiques seront nécessaires pour rendre d'une utilisation plus aisée la technique de Evans, *et al.*, 1986.

IV.3 : Variabilité phénotypique de la conductance interne chez le noyer, en réponse à l'éclairement et à un enrichissement en CO_2

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication (Piel et al., "Influence of local irradiance on CO_2 transfer conductance of mesophyll in walnut"), acceptée au Journal of Experimental Botany.

IV.3.1 : Introduction

L'anatomie foliaire ainsi que les caractéristiques photosynthétiques sont généralement variables en fonction des conditions d'éclairement rencontrées dans un couvert et dans la couronne d'un arbre (*cf.* Boardman, 1977 pour une revue). Les feuilles qui se sont développées dans un environnement d'ombre présentent le plus souvent une forme différente et des changements de l'organisation cellulaire du mésophylle, ainsi que des caractéristiques photosynthétiques et biochimiques particulières (Boardman, 1977, Chazdon et Kaufmann, 1993). Par rapport aux feuilles développées en pleine lumière, les feuilles d'ombre se caractérisent le plus souvent par de plus faibles surfaces, épaisseurs, masses surfaciques, teneurs en azote et Rubisco, assimilations nettes, respirations et conductances stomatiques (Anten, *et al.*, 1996, Boardman, 1977, Kappel et Flore, 1983, Le Roux, *et al.*, 1999a, Le Roux, *et al.*, 1999b, Le Roux, *et al.*, 2001b, Niinemets, *et al.*, 1998). Les caractéristiques anatomiques et photosynthétiques foliaires sont également affectée par une réponse à un enrichissement en CO_2 de l'atmosphère. Ainsi, des feuilles développées dans une atmosphère enrichie en CO_2 présentent le plus souvent des modifications anatomiques aussi bien que

photosynthétiques, comme de plus faibles assimilations nettes maximales et conductances stomatiques .

Toutefois, la variabilité de la conductance interne en réponse à l'éclairement est très mal connue, la plupart des recherches s'étant intéressées à des comparaisons interspécifiques (cf. §IV.2). La variabilité de la conductance interne en réponse à un enrichissement en CO₂ n'a pour sa part jamais été étudiée. Il a été montré qu'il existe une corrélation interspécifique entre l'assimilation nette et la conductance interne (cf. fig. 4.1). On peut ainsi théoriquement s'attendre à ce que la conductance interne soit variable au sein d'une même espèce en réponse à l'éclairement ou à un enrichissement en CO₂. Les rares travaux dédiés à l'étude de la variabilité intraspécifique de la conductance interne ont montré qu'elle varie en fonction de l'éclairement (Evans, *et al.*, 1994, Lloyd, *et al.*, 1992), l'âge de la feuille (Loreto, *et al.*, 1994, Miyazawa et Terashima, 2001, Scartazza, *et al.*, 1998), une sécheresse (Lauteri, *et al.*, 1997), et un stress salin (Delfine, *et al.*, 1999, Delfine, *et al.*, 1998). Une seule étude a été consacrée à l'influence de l'éclairement sur la conductance interne chez des ligneux (Lloyd, *et al.*, 1992). Ces auteurs ont montré que l'anatomie foliaire de jeunes ligneux (*Prunus persica* et *Citrus paradisi*) n'est que faiblement variable en réponse à un traitement d'ombre appliqué pendant la croissance, et que la conductance interne a faiblement diminué (de 20 à 25%). Toutefois la variabilité de la conductance interne en réponse à l'éclairement n'a jamais été étudié chez une espèce présentant de fortes modifications anatomiques et photosynthétiques en réponse à l'ombrage.

Les objectifs de cette étude ont été (i) d'étudier la variabilité des caractéristiques anatomiques et photosynthétiques foliaires du noyer en réponse à l'éclairement et à un enrichissement en CO₂, et (ii) d'identifier un caractère foliaire permettant de paramétrer les variations de conductance interne. Les feuilles du noyer sont connues pour présenter de fortes modifications anatomiques et photosynthétiques en fonction de leur localisation dans la couronne d'un arbre (Le Roux, *et al.*, 1999a, Le Roux, *et al.*, 1999b). Dans cette étude, les différences entre feuilles d'ombres et feuilles de lumières seront étudiées grâce à deux traitements lumineux d'ombre et de lumière appliqués à de jeunes noyers cultivés en extérieur. Une comparaison sera effectuée avec des feuilles d'ombres et de lumières collectées dans la couronne d'un noyer adulte. Parallèlement, l'effet d'une augmentation de la pression partielle de CO₂, sera étudié au moyen de jeunes noyer cultivés en extérieur en conditions de pleine lumière, et dont l'atmosphère environnant les feuilles est enrichi en CO₂ (700 μmol.mol⁻¹) à l'aide d'un branch-bag.

IV.3.2 : Matériel et méthodes

IV.3.2.1 : Matériel végétal

Jeunes noyers

Cette étude a été réalisée en Juillet 1999 sur de jeunes noyers hybrides (*Juglans nigra x regia*) de trois ans, sur le site de l'INRA de Clermont-Ferrand. Les arbres ont été cultivés en extérieur dans des pots de 35dm³, sur un mélange de sable et de tourbe (1/2 v/v), et irrigués de une à deux fois par jour selon la demande évaporative. Quelques jours après le débourrement, un rameau de chaque arbre a été placé dans un "tunnel" composé de plaques d'altuglass jouant le rôle de filtre. Deux types de filtres ont été utilisés pour simuler des environnements de pleine lumière et d'ombre. Pour l'environnement de pleine lumière, un filtre neutre transmettant 90±0,5% de l'éclairement incident a été utilisé, sans modification du spectre naturel (rapport rouge/rouge lointain = 1.25±0.01) mesuré en 5 positions pour chaque filtre à l'aide d'un spectroradiomètre (Li-1800, Licor Inc, Lincoln, USA). Pour le traitement d'ombre, un filtre vert transmettant 10±1% de l'éclairement incident a été utilisé (rapport rouge/rouge lointain = 0.22±0.01). Chaque rameau isolé sous un tunnel est également placé dans un branch-bag permettant de mesurer et de contrôler le microclimat environnant le rameau. La fraction molaire de CO₂ est de 350 μmol.mol⁻¹ pour les traitements d'ombre et de lumière. Un traitement enrichi en CO₂ ("fort CO₂") est obtenu en doublant la fraction molaire de CO₂ dans le branch-bag (700 μmol.mol⁻¹) sur un traitement de lumière. Chaque traitement (lumière, ombre, et fort CO₂) est appliqué à quatre arbres (quatre répétitions).

Noyer adulte

Une expérimentation a été réalisée en Août 1996 sur un noyer adulte de 20 ans (*Juglans regia*). L'arbre sélectionné avait 7,7m de hauteur, et une couronne de 6m de diamètre et 5m de hauteur. La surface foliaire totale était de 144m² pour une couronne représentant un volume de 95m³. L'arbre est localisé au milieu d'une parcelle de 1,5 ha, plantée en 1976 à Plauzat (France), à une densité de 100 ha⁻¹. Un échafaudage autour de l'arbre et une plateforme à l'intérieur de la couronne donnent un accès à la majeure partie du volume de la couronne. Une description complète de ce site expérimental est donnée dans (Le Roux, *et al.*, 1999b).

IV.3.2.2 : Echanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne

Jeunes noyers

Les échanges gazeux ont été mesurés à l'aide d'un dispositif portatif Licor-6400 équipé d'une chambre foliaire modifiée pour permettre une mesure de la fluorescence chlorophyllienne (cf. annexe I). Les fibres optiques de la chambre sont connectées à un fluorimètre modulé Mini-PAM (Walz GmbH, Allemagne). Afin de minimiser la diffusion du CO₂ par les joints en mousse de la chambre d'échanges gazeux, le gradient de fraction molaire de CO₂ entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre a été minimisé en enfermant la tête de la chambre dans un sac plastique dans lequel circule l'air provenant des deux cellules de l'IRGA (cf. description du dispositif dans l'annexe I). Les expérimentations ont été réalisées sur feuille détachée, comme précisé dans l'annexe I.

Noyer adulte

Les échanges gazeux ont été réalisés comme décrit précédemment avec un Li-6400, sur feuille attachée et pleinement développée. Les mesures ont été réalisées sous éclairage naturel, ajusté à l'aide de filtres gris neutre (en moyenne 900 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La fluorescence chlorophyllienne a été estimée simultanément aux échanges gazeux avec un Mini-PAM et l'adaptateur 6400-10 (Licor Inc., USA). Les feuilles ont été prélevées au centre de la couronne pour les feuilles d'ombre (quatre répétitions) et sur le bord sud de la couronne pour les feuilles de pleine lumière (six répétitions).

IV.3.2.3 : Estimation de la conductance interne (g^i), de la respiration à la lumière (R_l), et des vitesses maximales de carboxylation (V_c^{max}) et de transfert d'électrons (J^{max})

Chez les jeunes noyers, l'assimilation nette maximale (A_n^{max}) et la conductance stomatique maximale au CO₂ ($g_c^{s\ max}$) ont été estimés à fort éclairage (1500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La conductance interne a été estimée à l'aide du protocole à "J constant" (cf. chapitre II). Γ^* et l'inhibition de la respiration par la lumière ont été estimées au cours de cette étude, et sont donnés dans le chapitre II. Chez l'arbre adulte, la conductance interne a été estimée à l'aide du protocole à "J variable" (chapitre II), et le flux d'électron a été calculé à l'aide de l'équation 2.22. L'absorbance foliaire du noyer est 0,84 (Combes, *et al.*, 2000).

La vitesse maximale de carboxylation (V_c^{\max}) et la vitesse maximale de transfert d'électron (J^{\max}) ont été estimés d'après la méthode de Harley, *et al.*, 1992b sur des feuilles voisines de celles où la conductance interne a été estimée. Les paramètres apparents (*i.e.* non corrigés pour la conductance interne) ont été estimés en ajustant des courbes de réponse de A_n à C_{es} obtenues à éclairissement saturant ($1500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à l'aide des équations 1.17 et 1.23 (*cf.* chapitre I) respectivement pour V_c^{\max} et J^{\max} . Les paramètres corrigés pour la conductance interne ont été obtenus de la même manière, mais en ajustant des courbes de réponse de A_n à C_c .

V_c^{\max} n'a pas pu être estimé grâce à la méthode décrite précédemment pour les feuilles où g^i a été déterminé. Pour ces feuilles, V_c^{\max} apparent a été estimé de manière indirecte. Une très bonne corrélation entre l'azote foliaire (N_a) et V_c^{\max} a été trouvée chez le jeune noyer ($V_c^{\max} = 36.1 N_a - 2.79$, $r^2 = 0.79$, $n=36$, données non présentées). Ainsi, connaissant N_a des feuilles du jeune noyer utilisées pour estimer g^i , V_c^{\max} été déterminé pour ces feuilles grâce à la corrélation V_c^{\max} vs N_a donnée précédemment.

IV.3.2.4 : Masse surfacique (LMA), et teneurs en azote (N_a), en Rubisco, et en sucres non structuraux (TNC)

Les feuilles des jeunes arbres et de l'arbre mature ont été collectées immédiatement après les mesures d'échanges gazeux et de fluorescence. Leur surface a été mesurée à l'aide d'un planimètre (Delta T devices, Heddesdon, UK), avant d'être séchées et leur masse sèche mesurée afin d'estimer leur masse surfacique (LMA). La concentration en azote foliaire (N_a) a été estimée sur la base de la masse sèche à l'aide d'un analyseur élémentaire (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy). Les glucides non structuraux (TNC, "total non structural carbohydrates", comprenant glucose, fructose, saccharose et amidon) ont été extraits et quantifiés d'après le protocole décrit dans Frak, *et al.*, 2001. Le LMA a ensuite été calculé en retranchant les TNC de la masse sèche. La teneur en Rubisco a été déterminée sur 12 feuilles des jeunes noyers pour chaque traitement. Des disques de 5 cm^2 ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide, puis stockés à -80°C . La Rubisco a été extraite, puis sa teneur foliaire a été déterminée à l'aide d'un test Elisa suivant le protocole décrit dans Catt et Millard, 1988 et Frak, *et al.*, 2001.

Tableau 4.3 Épaisseurs des assises cellulaires du mésophylle de feuilles d'ombre et de lumière d'un noyer adulte provenant du campus de l'INRA de Clermont-Ferrand (*Juglans regia*) et des jeunes noyers de 4 ans (*Juglans nigra x regia*). L^{\min} et L^{\max} sont respectivement les épaisseurs foliaires minimales et maximales de feuilles prélevées. \square est la fraction de l'épaisseur du limbe occupée par l'épiderme et la cuticule. Les épaisseurs des parenchymes palissadique et lacuneux sont données en fraction de l'épaisseur du limbe. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente sont significativement différentes (test de Student, $\alpha=0.05$).

Arbre	Feuilles	L^{\min} μm	L^{\max} μm	\square	Parenchyme palissadique	Parenchyme lacuneux	n
Adulte	Lumière	164	194	0.09 \pm 0.01 ^a	0.57 \pm 0.06 ^a	0.34 \pm 0.06 ^a	7
Adulte	Ombre	116	159	0.10 \pm 0.01 ^a	0.52 \pm 0.05 ^a	0.37 \pm 0.06 ^a	9
Jeune (4 ans)	Lumière	149	209	0.11 \pm 0.02 ^a	0.59 \pm 0.07 ^a	0.31 \pm 0.07 ^a	9
Moyenne				0.10\pm0.01	0.56\pm0.06	0.34\pm0.06	25

Tableau 4.4 Épaisseur du limbe (L), masse surfacique (LMA), masse surfacique sans les glucides solubles (LMA sans TNC), teneur en azote (N_a) et en Rubisco (Rubisco) par unité de surface, pour les trois traitements chez le jeune noyer. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente diffèrent significativement (test de Student, $\alpha=0.05$).

Traitement	L mm	LMA $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	LMA sans TNC $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	N_a $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	Rubisco $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$
Lumière	0.15 \pm 0.01 ^a (n=7)	62.1 \pm 5.0 ^a (n=16)	51.8 \pm 4.3 ^a (n=12)	1.46 \pm 0.13 ^a (n=16)	2.97 \pm 0.51 ^a (n=12)
Ombre	0.10 \pm 0.01 ^b (n=7)	33.4 \pm 2 ^b (n=16)	28.9 \pm 1.7 ^b (n=12)	0.83 \pm 0.08 ^b (n=16)	1.46 \pm 0.8 ^b (n=12)
Fort CO ₂	0.15 \pm 0.01 ^a (n=7)	79.2 \pm 6.3 ^c (n=16)	58.5 \pm 5.2 ^c (n=12)	1.33 \pm 0.15 ^c (n=16)	2.40 \pm 0.74 ^c (n=11)

Tableau 4.5 Fractions de volume d'espaces gazeux dans le limbe (f_{ias}) et dans le mésophylle (f_{ias}^{mes}), densité de tissus du limbe (T_d), trajet moyen du CO_2 dans le mésophylle (\square), et estimation de la conductance dans les espaces intercellulaires (g^{ias}) d'après le modèle de Syvertsen *et al.* (1995). Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente sont significativement différents (test de Student, $\square=0.05$).

Traitement	f_{ias}	f_{ias}^{mes}	T_d kg.m ⁻³	\square mm	g^{ias} mol.m ⁻² .s ⁻¹	n
Lumière	0.17±0.02 ^a	0.19±0.02 ^a	502±99 ^{ab}	1.45±0.43 ^a	0.45±0.14 ^a	3
Ombre	0.23±0.02 ^b	0.25±0.03 ^b	392±4 ^a	0.72±0.21 ^b	0.91±0.23 ^b	4
Fort CO ₂	0.13±0.01 ^c	0.15±0.01 ^c	512±52 ^b	2.10±0.14 ^a	0.29±0.02 ^a	3

Tableau 4.6 Assimilation nette (A_n), conductance stomatique au CO_2 maximale ($g_c^{s\ max}$), conductance interne (g^i), rapport entre la fraction molaire de CO_2 dans les espaces évaporants intercellulaires et celle à la surface de la feuille (C_{es}/C_a), et rapport entre la fraction molaire à la surface de la feuille et celle aux sites enzymatiques de la Rubisco (C_c/C_s), pour les trois traitements chez le jeune Noyer. Les valeurs sont données \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente sont significativement différentes (test de Student, $\square=0.05$).

Traitement	A_n^{max} $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$g_c^{s\ max}$ mol.m ⁻² .s ⁻¹	g^i mol.m ⁻² .s ⁻¹	C_{es}/C_a	C_c/C_s
Lumière	15.8±1 ^a (n=12)	0.239±0.075 ^a (n=12)	0.192±0.039 ^a (n=8)	0.74±0.08 ^a (n=12)	0.50±0.08 ^a (n=12)
Ombre	9.1±1.4 ^b (n=12)	0.112±0.037 ^b (n=12)	0.086±0.013 ^b (n=6)	0.80±0.03 ^a (n=12)	0.50±0.05 ^a (n=12)
Fort CO ₂	14.1±1 ^c (n=12)	0.180±0.055 ^c (n=12)	0.166±0.04 ^a (n=7)	0.78±0.06 ^a (n=12)	0.53±0.06 ^a (n=12)

IV.3.2.5 : Épaisseur des assises cellulaires, fraction de volume d'espaces gazeux du mésophylle (f_{ias}^{mes}), trajet moyen de diffusion du CO_2 dans le mésophylle (\square) et conductance intercellulaire calculée (g^{ias} calculée) d'après le modèle de Syvertsen et al. (1995)

Les fractions de volume d'espaces gazeux de la feuille et du mésophylle (f_{ias} et f_{ias}^{mes}), le trajet moyen de diffusion du CO_2 dans le mésophylle (\square), et la conductance intercellulaire d'après le modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995 ont été estimés suivant les protocoles décrits dans le chapitre III. L'épaisseur des assises cellulaires du mésophylle a été estimée postérieurement à cette étude, sur de jeunes noyer cultivés en extérieurs, et sur un noyer adulte du campus de l'INRA de Clermont-Ferrand, suivant le protocole décrit dans le chapitre III.

IV.3.3 : Résultats

IV.3.3.1 : Principales caractéristiques anatomiques du mésophylle chez le noyer

Les feuilles du noyer sont strictement hypostomes. Les observations par microscopie optique ont révélé une organisation hétérobarique, le mésophylle étant cloisonné par des éléments vasculaires. L'épiderme (incluant la cuticule) et les parenchymes palissadique et lacuneux représentent une fraction constante de l'épaisseur foliaire chez les jeunes noyer hybride et un arbre mature, et aussi bien chez les feuilles d'ombre que de lumière (tableau 4.3). Le parenchyme palissadique est l'assise cellulaire la plus épaisse, et représente 56% du limbe, contre 34% pour le lacuneux (tableau 4.3).

IV.3.3.2 : Effet des traitements ombre et lumière et du traitement fort CO_2 , chez les jeunes noyers

Par comparaison avec les feuilles de lumière, les feuilles d'ombre présentent des LMA, épaisseur, f_{ias}^{mes} respectivement 46%, 33% et 24% plus faible et une distance de diffusion du CO_2 dans le mésophylle réduite de deux fois, tandis que les feuilles en fort CO_2 présentent des mêmes épaisseurs foliaires et distances de diffusion du CO_2 , et des LMA et f_{ias}^{mes} environ 20% plus faibles (tableaux 4.4 et 4.5). Toutefois, l'effet du traitement fort CO_2 sur le LMA par rapport au traitement de lumière n'est plus que de 11% lorsque l'on considère le LMA sans les glucides non structuraux (tableau 4.4). Les traitements ombre et fort CO_2 n'ont pas induit de

Tableau 4.7 Masse surfacique (LMA), teneur en azote par unité de surface (N_a), assimilation nette estimée à fort éclairciment (A_n) et conductance interne (g^i) des feuilles d'ombre et de lumière prélevées dans la couronne de l'arbre adulte de Plauzat. A_n a été mesuré pour un éclairciment de $900 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les données sont indiquées \pm l'écart-type (n-1). Pour chaque colonne, les valeurs avec une lettre différente sont significativement différentes (test de student, $\alpha=0.05$).

Feuilles	LMA g.m^{-2}	N_a g.m^{-2}	A_n $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g^i $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Lumière	115.3 ± 9.7^a (n=6)	2.53 ± 0.15^a (n=6)	14.4 ± 0.9^a (n=5)	0.219 ± 0.06^a (n=6)
Ombre	69.8 ± 8.9^b (n=4)	1.31 ± 0.14^b (n=4)	6.1 ± 1.5^b (n=5)	0.077 ± 0.033^b (n=4)

Figure 4.3 : Vitesse maximale de carboxylation (V_c^{max}), vitesse maximale de transfert d'électrons (J^{max}), et ratio $J^{\text{max}} / V_c^{\text{max}}$ estimés chez le jeune noyer pour les traitements de lumière (barres blanches), d'ombre (barres noires) et fort CO_2 (barres hachurées). Ces paramètres ont été déterminés sans ("apparent") et avec ("corrigé") une correction pour la conductance interne. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type (n-1), et des lettres distinctes signalent les données significativement différentes (test de student, $\alpha=0.05$).

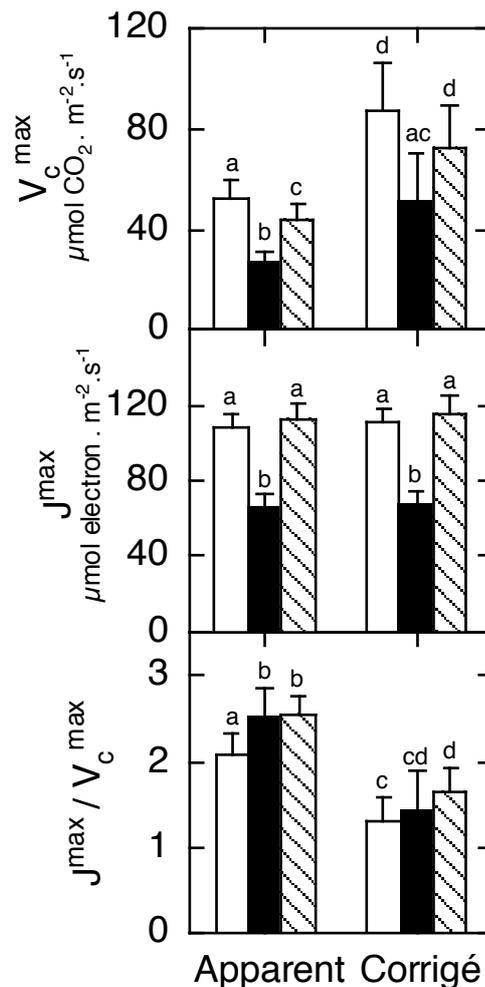
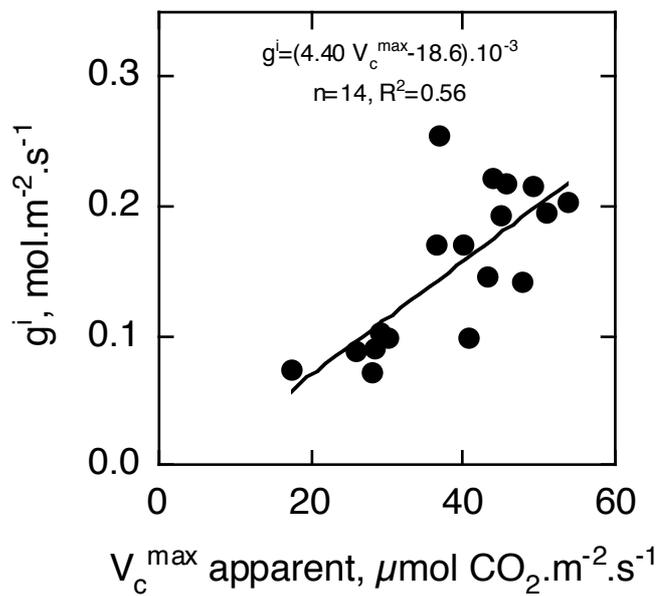


Figure 4.4 Relation entre la conductance interne (g^i) et la vitesse maximale apparente de carboxylation par la Rubisco (V_c^{\max} apparent) pour les trois traitements du jeune noyer. V_c^{\max} apparent n'a pas été estimé de manière directe, mais indirecte à partir de la teneur en azote (N_a), grâce à l'excellente corrélation V_c^{\max} vs N_a obtenue chez les jeunes noyers.



modification significative de la densité de tissus du mésophylle par rapport au traitement de lumière (tableau 4.5).

Par rapport aux feuilles de lumière, les feuilles d'ombre ont de plus faibles A_n^{\max} , g_c^{\max} et g^i (respectivement 42%, 53% et 55% moins élevées), tandis les feuilles en fort CO_2 ont une A_n^{\max} et une g_c^{\max} respectivement 11% et 25% plus faibles, et une g^i non significativement différente (tableau 4.6). La conductance en phase gazeuse intercellulaire estimée d'après le modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995 est 50% plus élevée pour les feuilles d'ombre, et 36% moins élevée chez les feuilles fort CO_2 par rapport au traitement lumière (tableau 4.5). Les rapports C_{es}/C_a et C_c/C_a ne diffèrent pas significativement entre les traitements, et leurs valeurs moyennes sont 0.77 et 0.51 respectivement (tableau 4.6). V_c^{\max} apparent est dans tous les cas significativement plus faible que le V_c^{\max} corrigé pour g^i , tandis que J^{\max} n'est pas affecté par la prise en compte de g^i . (figure 4.3). Par comparaison avec les feuilles de lumière, V_c^{\max} et J^{\max} sont tous deux significativement plus faibles pour les feuilles d'ombre, tandis que chez les feuilles fort CO_2 , V_c^{\max} apparent est légèrement plus faible, et V_c^{\max} corrigé et J^{\max} ne sont pas significativement différents. Le ratio J^{\max} / V_c^{\max} corrigé est significativement plus faible que le ratio apparent. Par rapport au traitement lumière, J^{\max} / V_c^{\max} apparent est environ 17% plus élevé pour les traitements ombre et fort CO_2 , tandis que le ratio corrigé pour g^i n'est pas significativement différent entre ombre et lumière, et est significativement plus élevé chez les feuilles fort CO_2 .

IV.3.3.3 : Feuilles d'ombre et de lumière du noyer adulte

Chez le noyer adulte, les feuilles d'ombre ont un LMA et une teneur en azote respectivement 39% et 48% plus faibles que les feuilles de lumière (tableau 4.7). L'assimilation à fort éclaircissement ainsi que g^i sont respectivement 59% et 64% plus faibles chez les feuilles d'ombre. L'éclaircissement pour lequel l'assimilation a été mesuré n'était pas complètement saturant, et nous avons jugé que A_n estimé dans ces conditions est approximativement 7% inférieur à A_n^{\max} (données non présentées).

IV.3.3.4 : Relations entre la conductance interne et les caractéristiques foliaires

Pour les trois traitements du jeune noyer, la conductance interne est positivement corrélée avec V_c^{\max} apparent (figure 4.4). Pour les seuls traitements ombre et lumière, la relation obtenue est $g^i = (4.49 V_c^{\max} - 20.2) \cdot 10^{-3}$, avec $n=14$ et $r^2=0.59$ (données non présentées). La

Figure 4.5 : Relations entre la conductance interne (g^i) et l'épaisseur foliaire (L), la fraction de volume d'espaces gazeux dans le mésophylle (f_{ias}^{mes}), et la distance de diffusion du CO_2 dans le mésophylle entre les faces abaxiale et adaxiale (\square) pour les trois traitements des jeunes noyers.

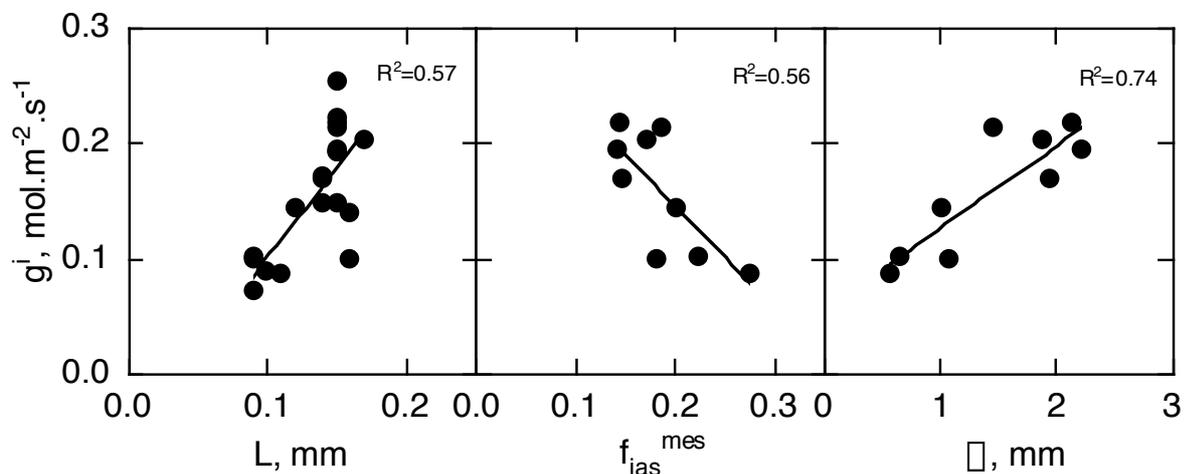
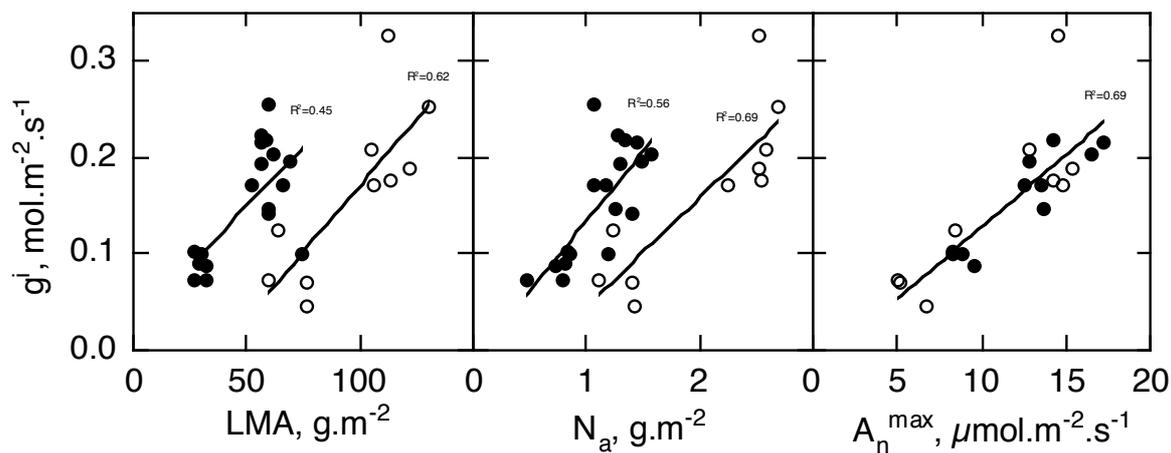


Figure 4.6 : Relations entre la conductance interne (g^i) et la masse surfacique (LMA), la teneur en azote par unité de surface foliaire (N_a), et l'assimilation nette maximale (A_n^{max}), obtenues pour les trois traitements appliqués aux jeunes noyer (ronds noirs), et pour les feuilles d'ombre et de lumière de l'arbre adulte (ronds blancs).



conductance interne est également positivement corrélée avec l'épaisseur foliaire et la distance de diffusion du CO₂ dans le mésophylle, et négativement corrélée avec la fraction de volume d'espaces gazeux du mésophylle (figure 4.5). Chez les jeunes noyer et l'arbre adulte, la conductance interne est positivement corrélée avec le LMA, N_a et A_n^{max} (figure 4.6). Les relations gⁱ vs LMA et gⁱ vs N_a sont toutes deux distinctes entre les feuilles du jeune noyer et celles de l'arbre adulte. Par contre, une même relation est observée entre gⁱ et A_n^{max} pour les deux jeux de données.

IV.3.4 : Discussion

IV.3.4.1 : Effet de l'environnement lumineux

De fortes réponses anatomiques et photosynthétiques à l'environnement lumineux ont été observées chez le noyer. Chez le jeune noyer, les fortes diminutions de LMA, d'épaisseur foliaire et de f_{ias}^{mes} induites par le traitement d'ombre révèlent de fortes modifications de la structure du mésophylle, et un mésophylle arrangé de manière plus compacte chez les feuilles d'ombre. Parallèlement, A_n^{max}, gⁱ, g_c^{s max} sont environ deux fois plus faibles chez les feuilles d'ombres par rapport aux feuilles de lumière. Les teneurs en azote et en Rubisco ont également été fortement réduites par le traitement d'ombre. La variation d'A_n, gⁱ, LMA et N_a observée entre feuilles d'ombre et de lumière chez l'arbre adulte et du même ordre de grandeur que la variation en réponse au traitement lumineux chez les jeunes noyers. Ces résultats confirment que les feuilles du noyer répondent très fortement à l'environnement lumineux, et montrent que nos traitements ont provoqué chez les jeunes noyers des modifications similaires à celles observées dans des environnement naturels d'ombre et de lumière dans la couronne de l'arbre adulte (Le Roux, *et al.*, 1999a, Le Roux, *et al.*, 1999b). Toutefois, LMA et N_a sont 40 à 50% plus élevés chez l'arbre adulte que chez les jeunes noyers pour un environnement lumineux donné. Ces fortes différences de LMA et de N_a, alors que l'assimilation nette est assez proche entre les jeunes arbres et l'arbre adulte, sont susceptibles de refléter des changements de la structure et de la composition foliaire, et des changements de la fraction d'azote allouée à l'appareil photosynthétique, qui peuvent résulter de différences d'âge des arbres ou de génotype. De plus, les feuilles de l'arbre adulte sont exposées à des stress environnementaux pouvant être à l'origine de tissus plus denses et sclérifiés, ainsi qu'à des modifications de l'organisation du mésophylle (Castro-Diez, *et al.*, 2000).

IV.3.4.2 : Effet d'un enrichissement en CO₂

Les réponses anatomiques et photosynthétiques des feuilles de jeunes noyers à un enrichissement en CO₂ ont été beaucoup moins marquées que celles en réponse au traitement lumineux. Par rapport au traitement témoin, les feuilles du traitement "fort CO₂" présentent un LMA et un f_{ias}^{mes} environ 21% plus faibles, et une même épaisseur et densité de tissus. Toutefois, lorsque le LMA est calculé sans les glucides non structuraux, la diminution n'est plus que de 11%. Ces résultats suggèrent que la principale différence entre les feuilles du traitement fort CO₂ par rapport aux feuilles témoin est un mésophylle organisé de manière plus compacte. Les échanges gazeux photosynthétiques ont été également faiblement affectés, avec une A_n à fort éclairage et une conductance stomatique diminuées respectivement de 11% et 25%. La conductance interne a subi une diminution (non significative à $\alpha=5\%$) du même ordre de grandeur que celle de A_n^{max} . Cet effet de l'enrichissement en CO₂ sur l'assimilation et la conductance stomatique peut être interprétée comme une acclimatation de la photosynthèse.

IV.3.4.3 : Relations entre la conductance interne et les caractéristiques foliaires

Des corrélations positives ont été trouvées entre la conductance interne et A_n^{max} en réponse à nos traitements et dans la couronne de l'arbre adulte, et ces relations n'étaient pas différentes entre elles. Ainsi, en dépit d'un fort écart de LMA et de différences anatomiques entre les jeunes arbres et l'arbre adulte, une même relation g^i vs A_n^{max} a été obtenue. Une relation très proche avait déjà été observée en rassemblant les données expérimentales obtenues de plusieurs études aussi bien pour des ligneux que des herbacées (cf. §IV.2, ainsi que Evans et Loreto, 2000). Ces résultats indiquent qu'une relation unique robuste permet de décrire la variabilité intraspécifique de la conductance interne pendant l'acclimatation à la lumière chez le noyer, ainsi que la variabilité interspécifique. De plus, nous avons constaté que g^i et V_c^{max} apparent sont positivement corrélés chez les jeunes noyers (les données V_c^{max} apparent ne sont pas disponibles chez l'arbre adulte). Cette relation peut être utilisée pour décrire la variabilité de g^i lors de l'acclimatation à la lumière chez le noyer. Ainsi, nous avons utilisé récemment cette approche pour paramétrer g^i dans un modèle de photosynthèse foliaire chez le noyer afin

d'étudier la distribution spatiale de l'efficacité d'utilisation de l'eau et de la discrimination du carbone dans la couronne d'un noyer (Le Roux, *et al.*, 2001a).

Des corrélations positives ont été trouvées entre g^i et LMA, mais ces relations sont parallèles et clairement distinctes entre les jeunes noyers et l'arbre adulte. Une corrélation positive entre g^i et LMA a été observée par Evans, *et al.*, 1994 chez des feuilles de tabac cultivées sous deux éclairagements. Syvertsen, *et al.*, 1995 ont pour leur part trouvé une corrélation négative entre g^i et le LMA lors d'une comparaison interspécifique chez des ligneux, et une corrélation positive en comparant l'effet de l'éclaircement au sein d'une espèce. L'acclimatation à l'éclaircement a résulté en une corrélation positive entre g^i et l'épaisseur foliaire, et négative entre g^i et f_{ias} , aussi bien dans notre étude que dans la leur. Dans leur étude, *Citrus paradisi* est une exception puisque aucune corrélation n'est observée entre g^i et f_{ias} (Syvertsen, *et al.*, 1995). Dans ces études, la distance effective de diffusion du CO_2 dans le mésophylle entre les deux surfaces foliaires (Δ) est positivement corrélée à la conductance interne. La conductance au CO_2 dans les espaces gazeux intercellulaires (g^{ias}) estimée sur la base de Δ d'après le modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995, est très élevée chez les feuilles d'ombre, et est plus faible chez les feuilles de lumière et fort CO_2 . Ainsi, g^{ias} ne représenterait qu'une contrainte mineure sur la conductance interne des feuilles d'ombre, et une contrainte plus importante chez les feuilles de lumière et sous fort CO_2 . Toutefois, la conductance interne est plus élevée chez les feuilles de lumière et sous fort CO_2 que chez les feuilles d'ombre, et par conséquent la plus faible g^{ias} des feuilles de lumière et fort CO_2 est compensée par une plus forte conductance en phase liquide cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans le chapitre III, mais doivent toutefois être considérées avec précaution car le modèle de Syvertsen, *et al.*, 1995 ne semble fournir qu'un ordre de grandeur de g^{ias} (*cf.* chapitre III).

D'autre part, nous confirmons que si LMA et g^i peuvent refléter les changements anatomiques induits par l'acclimatation à la lumière ou au fort CO_2 , (eg. épaisseur, f_{ias}), la relation g^i vs LMA reste fortement dépendante de l'espèce, de l'âge ou des conditions de culture. Ainsi, étant donné que la relation g^i vs A_n^{max} reste très peu variable entre les espèces ou au sein d'une espèce, la relation entre g^i et LMA sera très peu conservée lorsque l'on n'obtient pas de bonne relation entre LMA et A_n^{max} , ce qui est une situation fréquente pendant le vieillissement foliaire, ainsi que lors de l'acclimatation à une modification de l'environnement lumineux (Frak, *et al.*, 2001). De même, lorsque l'on n'obtient pas de bonne corrélation entre A_n^{max} et N_a , la relation entre g^i et N_a sera très peu conservée.

IV.3.4.4 : Vitesse maximale de carboxylation par la Rubisco (V_c^{\max}) et flux maximal d'électrons (J^{\max})

V_c^{\max} augmente largement lorsque l'on prend en compte g^i pour son estimation, tandis que J^{\max} reste inchangé. Ces résultats confirment ainsi les travaux de Lloyd, *et al.*, 1992 et Epron, *et al.*, 1995. D'autre part, le rapport J^{\max}/V_c^{\max} augmente lorsque l'on prend en compte g^i pour son estimation, mais par contre les différences entre les trois traitements sont très faibles, et ne changent pas que l'on prenne ou non en compte g^i . Ce résultat confirme que les variations de J^{\max} et V_c^{\max} sont étroitement corrélées sous de nombreuses conditions de croissance (Von Caemmerer et Farquhar, 1981). La très faible variabilité de J^{\max}/V_c^{\max} pendant l'acclimatation à la lumière ainsi qu'en réponse à un enrichissement en CO_2 indique que C_c pour laquelle la régénération du RubP et le flux d'électrons limitent également l'assimilation (*cf.* chapitre I pour une définition) ne changent que très faiblement. Ce résultat confirme les précédentes études réalisées sans prendre en compte g^i (*cf.* Von Caemmerer, 2000). Ce résultat résulte de la très bonne corrélation entre g^i et A_n^{\max} lors de l'acclimatation à la lumière et de la réponse à un enrichissement en CO_2 , qui a pour conséquence un gradient entre C_{es} et C_c invariant à éclairement saturant.

IV.3.5 : Conclusion

Les caractéristiques anatomiques et photosynthétiques du noyer varient très fortement en réponse à l'environnement lumineux, et faiblement en réponse à un enrichissement en CO_2 . L'effet de l'environnement lumineux est accompagné par une forte variation de la conductance interne, tandis que l'enrichissement en CO_2 n'a pas d'effet significatif sur g^i . Nous avons montré que la corrélation entre g^i et A_n^{\max} observée entre espèces est conservée chez le noyer lors de l'acclimatation à l'éclairement et à un enrichissement en CO_2 . Ainsi, A_n^{\max} et V_c^{\max} peuvent être utilisés pour paramétrer les variations de g^i en réponse à l'éclairement et à un enrichissement en CO_2 , et doivent être préférés à des paramètres anatomiques ou à N_a . Toutefois, la variabilité intraspécifique de la relation g^i vs A_n^{\max} doit être documentée chez d'autres espèces, et en réponse à d'autres facteurs comme la température foliaire. Nous suggérons également d'estimer systématiquement V_c^{\max} simultanément à g^i dans les études ultérieures, afin de pouvoir confirmer la faible variabilité de la relation g^i vs V_c^{\max} , et ainsi permettre de paramétrer g^i pour la modélisation de la photosynthèse.

Grâce à cette relation g^i vs V_c^{\max} obtenue lors de cette étude, nous avons ensuite paramétré explicitement g^i dans un modèle de discrimination foliaire du ^{13}C chez le noyer. Dans un travail réalisé en collaboration (Le Roux, *et al.*, 2001a), nous montrons qu'il est indispensable de prendre en compte g^i pour prédire de manière fiable la distribution dans la couronne d'un noyer de la teneur isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire.

IV.4 : Conclusion

La conductance interne est très variable selon les espèces, ainsi que chez le noyer en réponse à un traitement lumineux et à la position des feuilles dans la couronne d'un arbre. Nos résultats suggèrent que la variabilité interspécifique et intraspécifique de g^i n'est pas liée à des caractéristiques anatomiques telles que l'épaisseur foliaire, la fraction de volume d'espaces gazeux foliaires, la densité de tissus et le LMA. Par contre, la corrélation interspécifique entre A_n^{\max} et g^i paraît robuste, et n'est pas différente de celle obtenue chez le noyer.

L'analyse des données publiées précédemment, ainsi que les résultats que nous avons obtenu chez le lamier d'ombre montrent clairement que l'opposition entre ligneux et herbacées concernant la conductance interne n'est pas pertinente. Ces travaux font ainsi ressortir qu'il existe une étroite coordination des variations de g^i , A_n^{\max} et g_c^{\max} aussi bien entre espèces qu'au sein d'une même espèce. Toutefois, il sera nécessaire de continuer à documenter la variabilité interspécifique de g^i chez des herbacées à faible assimilation, ainsi que chez des ligneux à forte assimilation en conditions naturelles. Il sera également nécessaire de continuer à étudier la variabilité intraspécifique de g^i . En particulier la sensibilité instantanée et à long terme de g^i à la température foliaire, reste pour le moment inconnue.

La vitesse maximale de carboxylation par la Rubisco (V_c^{\max} , qui est un paramètre important du modèle de Farquhar, *et al.*, 1980) telle qu'elle est déterminée dans la plupart des études est une valeur apparente, qui intègre une composante diffusive du CO_2 . C'est le cas, par exemple de tous les V_c^{\max} mentionnés dans la revue de Wullschlegel, 1993. La valeur réelle de V_c^{\max} ne peut être estimée que si la valeur de g^i est connue. Toutefois, les conséquences sur la modélisation de l'assimilation nette (à l'aide du modèle de Farquhar, *et al.*, 1980) de l'absence de prise en compte de g^i sont a priori négligeables. En effet, g^i et sa variabilité sont inclus dans le V_c^{\max} apparent, et donc implicitement paramétrés dans le modèle. Toutefois, les études physiologiques reposant sur une connaissance précise de la valeur absolue de V_c^{\max}

peuvent être fortement biaisées puisqu'il peut y avoir presque un facteur deux entre sa valeur apparente et sa valeur réelle. Un correctif simple de V_c^{\max} apparent pour déterminer le V_c^{\max} réel ne pourra être envisagé que lorsque l'on connaîtra de manière beaucoup plus détaillée la variabilité intraspécifique de g^i , et tout particulièrement sa dépendance à la température. D'autre part, notre étude chez le noyer a permis de montrer que les V_c^{\max} apparents et corrigés corrélaient avec g^i . Cette corrélation a été utilisée avec succès pour paramétrer g^i dans un modèle de photosynthèse foliaire (Le Roux, *et al.*, 2001a). Comme nous l'avons illustré dans le chapitre I, le C_{es} pour lequel s'opère la transition entre limitation par la Rubisco et la limitation par le flux d'électrons augmente si g^i diminue. Ainsi, le fait que ce C_{es} de transition soit très peu variable entre espèces et pour différentes conditions de croissance, et que V_c^{\max} apparent soit étroitement corrélé avec J^{\max} (Von Caemmerer et Farquhar, 1981, Wullschleger, 1993, Leuning, 1997) suggère fortement que la relation entre g^i et V_c^{\max} est conservée entre espèces.

Enfin, grâce à la paramétrisation de g^i dans un modèle de discrimination foliaire du ^{13}C chez le noyer, nous montrons qu'il est indispensable de prendre en compte g^i pour prédire de manière fiable la répartition spatiale dans la couronne d'un arbre de la teneur isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire (Le Roux, *et al.*, 2001a).

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Variabilité de Γ^* et de R_o , et conséquences pour l'estimation de la conductance interne par la méthode de Harley, et al., 1992 (Chapitre II)

Mon travail de thèse a débuté par un travail méthodologique sur l'estimation de g^i . Nous avons tout d'abord estimé Γ^* et la respiration à la lumière, qui sont des paramètres nécessaires à l'estimation de g^i par la méthode que nous avons sélectionnée (méthode de Harley, *et al.*, 1992).

Nous confirmons que la respiration est dans tous les cas largement inhibée à la lumière, et montrons que l'utilisation de R_{obs} à la place de R_d mène à une surestimation de g^i . Par conséquent, R_l doit être systématiquement estimée préalablement à toute estimation de g^i .

Pour estimer Γ^* , nous avons testé les deux principales approches *in vivo* disponibles dans la littérature. Nous avons tout d'abord montré que l'approche de Sumberg et Laisk, 1995 (basée sur une analyse de la relation entre le point de compensation pour le CO_2 et la concentration en O_2), très attrayante car d'une utilisation relativement simple, fournit des estimations erronées. Nous proposons une version corrigée de cette méthode, mais qui est malheureusement difficilement applicable à d'autres espèces que le tabac. Nous avons ensuite testé l'approche de Brooks et Farquhar, 1985, basée sur une analyse des relations A_n vs C_{es} . Nous confirmons le fait que cette technique ne fournit qu'une valeur apparente de Γ^* pour les espèces à faible g^i . Ainsi, certaines valeurs de Γ^* publiées sont potentiellement sous estimées. Afin de résoudre ce problème, nous avons élaboré une approche originale pour estimer simultanément g^i et Γ^* basée sur une mesure combinée d'échanges gazeux foliaires et de fluorescence chlorophyllienne, et qui nous a permis d'estimer Γ^* de manière fiable chez nos espèces. Nos travaux ainsi qu'une analyse bibliographique révèlent que le point de compensation pour le CO_2 en l'absence de photorespiration (Γ^* , qui est un paramètre lié au facteur de spécificité de la Rubisco), est variable entre les espèces. Cette variabilité a plusieurs conséquences importantes.

Tout d'abord, lors du développement de leur méthode pour estimer g^i , Harley, *et al.*, 1992 ont clairement mis en évidence une forte sensibilité à une erreur sur Γ^* . Toutefois, ces auteurs considéraient *a priori* que Γ^* est constant au sein d'une espèce, et très peu variable chez les espèces en C3. Nos résultats montrent clairement que ce n'est pas le cas et qu'il est indispensable d'estimer Γ^* préalablement à toute estimation de g^i chez une espèce donnée.

D'autre part, Γ^* est un paramètre du modèle de Farquhar *et al.* (1981), et les conséquences de sa variabilité sur les résultats du modèle restent à évaluer. Une autre conséquence est une erreur dans l'estimation de V_c^{\max} , dont l'estimation nécessite également de connaître Γ^* . Ainsi, une étude beaucoup plus large que la notre sera nécessaire pour mieux documenter la variabilité interspécifique de Γ^* , et également intraspécifique qui n'a été que très rarement abordée. Dans notre étude réalisée chez le noyer, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un effet significatif des traitements d'ombre et de lumière, et cette absence de variabilité reste donc à vérifier. Enfin, il sera nécessaire de mieux comprendre les causes de cette variabilité de Γ^* . Une hypothèse permettant d'expliquer cette variabilité interspécifique serait l'existence d'une faible variabilité de la structure de la Rubisco parmi les végétaux en C3.

Ces contraintes imposées par la nécessité d'estimer Γ^* et R_d rendent la méthode d'estimation de g^i par les échanges gazeux et la fluorescence chlorophyllienne d'une utilisation beaucoup moins aisée, et diminue fortement l'attrait qu'elle pouvait présenter par rapport à la méthode reposant sur la discrimination du $^{13}\text{CO}_2$, réputée plus complexe. Il serait ainsi souhaitable de simplifier l'utilisation cette dernière méthode basée sur la discrimination du $^{13}\text{CO}_2$.

Composantes en phase gazeuse intercellulaire et en phase liquide cellulaire de la conductance interne (Chapitre III)

La seconde partie de mon travail de thèse à consister à quantifier les contributions des deux composantes de la conductance interne : la conductance en phase gazeuse intercellulaire, et la conductance en phase liquide cellulaire. Jusqu'à aujourd'hui, aucun travail expérimental n'avait permis de quantifier ces deux conductances. Nos résultats suggèrent que la principale composante de la conductance interne est la conductance en phase liquide cellulaire. Seul le chêne vert a présenté une contribution significative, bien que minoritaire, de la conductance en phase gazeuse intercellulaire (environ 30% de la résistance interne). Les facteurs anatomiques déterminant la contribution en phase gazeuse observée chez le chêne vert n'ont pas pu être identifiés. Les liens entre organisation du mésophylle et diffusion gazeuse s'avèrent d'une grande complexité à étudier. Des pistes permettant d'orienter de futures investigations pourraient être obtenues par des travaux de modélisation.

Toutefois, nos résultats suggèrent de concentrer les futures investigations sur l'identification des facteurs influençant la diffusion du CO₂ dans la phase liquide cellulaire. Les variations de conductance en phase liquide peuvent résulter de modification de la surface d'échange (surface de chloroplaste exposée aux espaces gazeux intercellulaires), de modification des perméabilité au CO₂ des constituants cellulaires, ou de l'activité d'éventuels mécanismes facilitant (ou non) la diffusion du CO₂ en phase liquide (*eg.* anhydrase carbonique). Des résultats préliminaires obtenus durant cette thèse contredisent l'hypothèse d'une facilitation de la diffusion du CO₂ dans le chloroplaste par l'anhydrase carbonique. Ces travaux seront très prochainement complétés par d'autres expérimentations menées au CEA-Cadarache (D. Bruhn, B. Genty, communication personnelle). Il sera également nécessaire de déterminer si la diffusion du CO₂ dans la cellule est uniquement passive, ou si d'éventuels mécanismes actifs (comme des transporteurs) interviennent.

Variabilité inter et intraspécifique de la conductance interne (chapitre IV)

Une analyse des données publiées ainsi que celle obtenue pendant cette thèse montrent que g^i est fortement variable entre les espèces, et corrèle avec la conductance stomatique et A_n^{\max} . Nos données confirment la robustesse de la corrélation interspécifique entre g^i et A_n^{\max} . Comme le montre notre étude réalisée chez le lamier d'ombre, une faible g^i n'est pas une caractéristique propre aux espèces ligneuses. Une distinction entre ligneux et herbacées n'est par conséquent pas pertinente. La plupart des données publiées ont en effet été obtenues pour des herbacées à forte assimilation, et pour des ligneux à faible assimilation (le plus souvent de jeunes arbres cultivés en pot), pour des raisons de facilité de culture ou par nécessité de travailler en laboratoire. Il sera ainsi nécessaire de poursuivre des expérimentations sur des herbacées à faible assimilation, ainsi que sur des arbres en conditions naturelles. Etant donné que la méthode couplant échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne n'est pas utilisable pour estimer de fortes g^i , des développements méthodologiques seront indispensables (*eg.* utilisation de la technique d'Evans *et al.*, 1986 sur le terrain).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la variabilité intraspécifique de g^i , qui est très mal documentée. Notre étude réalisée chez le noyer montre que g^i est fortement variable en fonction de l'environnement lumineux, aussi bien en conditions contrôlées qu'en conditions naturelles. Nos résultats montrent que la variabilité de g^i n'est pas liée à des paramètres anatomiques (LMA, épaisseur foliaire, volume d'espaces gazeux), et confirment la robustesse de la relation entre g^i et A_n^{\max} , qui est la même entre espèce et au sein d'une espèce. Chez le

noyer, nous montrons qu'il existe une corrélation entre g^i et V_c^{max} , et présentons des arguments suggérant qu'il est probable que cette relation ne varie que très faiblement entre espèces. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une étroite coordination entre g^i et plusieurs paramètres photosynthétiques foliaires (A_n^{max} , $g_c^{s,max}$, V_c^{max}). Cette coordination, ainsi que l'indépendance de g^i vis à vis de l'anatomie du mésophylle, suggère l'existence de mécanismes de régulation cellulaires de la diffusion du CO_2 .

Nous avons proposé d'utiliser la relation entre g^i et V_c^{max} obtenue chez le noyer pour paramétrer g^i dans un modèle de photosynthèse foliaire ou de discrimination du $^{13}CO_2$. Ainsi, grâce à une approche par modélisation réalisée dans le cadre d'une collaboration avec X. Le Roux (Le Roux *et al.*, 2001), nous montrons qu'il est indispensable de prendre en compte g^i pour prédire de manière fiable la répartition de la teneur en ^{13}C de la matière organique foliaire dans la couronne d'un noyer. Toutefois, avant d'entreprendre d'autres études par modélisation chez d'autres espèces, il sera toutefois nécessaire de documenter la variabilité interspécifique de la relation g^i vs V_c^{max} . Une approche par modélisation pourra également être envisagée pour analyser les contributions relatives des facteurs limitant l'assimilation du CO_2 , *ie.* de dissocier les contributions (i) des facteurs diffusifs (conductance stomatique et interne) et (ii) des facteurs biochimiques (capacité de carboxylation par la Rubisco, et utilisation du flux d'électrons photosynthétique).

Enfin, il apparaît indispensable de continuer à documenter la variabilité intraspécifique de la conductance interne. En particulier, il sera nécessaire d'étudier la sensibilité de la conductance interne à la température foliaire à différents pas de temps.

En conclusion, nous proposons d'orienter les recherches futures selon plusieurs axes : (i) la recherche au niveau cellulaire des facteurs expliquant la variabilité de g^i , et son étroite coordination avec A_n^{max} et V_c^{max} (eg. anhydrase carbonique, transport actif du CO_2); (ii) poursuivre la caractérisation de la variabilité intraspécifique de g^i (et en premier lieu, sa dépendance à la température foliaire); et enfin (iii) étudier les conséquences de la variabilité de g^i à plusieurs échelles (plante / couvert / écosystème), qui pourra être abordée par modélisation dès que l'on sera en mesure de prédire les variations de g^i (eg. paramétrisation à l'aide de V_c^{max}).

BIBLIOGRAPHIE

- Aalto T.** (1998). Gas exchange of scots pine shoots : stomatal modelling and field measurements, Ph.D. thesis, University of Helsinki.
- Anten N.P.R., Hernandez R., Medina E.M.** (1996). The photosynthetic capacity and leaf nitrogen concentration as related to light regime in shade leaves of a montane tropical forest tree, *Tetrorchidium rubrivenium*. *Functional Ecology*: 491-500.
- Atkin O.K., Evans J.R., Ball M.C., Lambers H., Pons T.L.** (2000). Leaf respiration of Snow Gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiology*, **122**: 915-923.
- Atkin O.K., Evans J.R., Siebke K.** (1998). Relationship between the inhibition of leaf respiration by light and enhancement of leaf dark respiration following light treatment. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 437-443.
- Badeck F.W., Liozon R., Genty B., Meyer S., Saugier B.** (1997). On the significance of internal resistance in tree leaves for gas exchange under elevated CO₂. In Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems. G. M. J. Mohren Eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 35-39.
- Balaguer L., Afif D., Dizengremel P., Dreyer E.** (1996). Specificity factor of ribulose carboxylase oxygenase of *Quercus robur*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **34**: 879-883.
- Ball B.C.** (1981). Modelling soil pores as tubes using gas permeabilities, gas diffusivities and water release. *Journal of Soil Science*, **32**: 465-481.
- Ball T.J.** (1987). Calculations related to gas exchange. In Stomatal Function. E. Zeiger, G. D. Farquhar et I. R. Cowan Eds. Stanford University Press. Stanford. pp 445-476.
- Boardman N.K.** (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **28**: 355-377.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Draxler G.** (1993). Functional leaf anatomy. In Photosynthesis and production in a changing environment : a field and laboratory manual. D. O. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhàr-Nordenkamp, R. C. Leegood et S. P. Long Eds. Chapman and Hall. London. pp 91-112.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Öquist G.** (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In Photosynthesis and production in a changing environment : a field and laboratory manual. D. O. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhàr-Nordenkamp, R. C. Leegood et S. P. Long Eds. Chapman and Hall. London. pp 193-206.
- Boyer J.S., Chin Wong S., Farquhar G.D.** (1997). CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology*, **114**: 185-191.

- Brooks A., Farquhar G.D.** (1985). Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light : estimates from gas exchange measurements on spinach. *Planta*, **165**: 397-406.
- Buck A.L.** (1981). New equations for computing vapor pressure and enhancement factor. *Journal of Applied Meteorology*, **20**: 1527-1532.
- Castro-Diez P., Puyravaud J.P., Cornelissen J.H.C.** (2000). Leaf structure and anatomy as related to leaf mass per area variation in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia*, **124**: 476-486.
- Catt J.W., Millard P.** (1988). The measurement of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase concentration in the leaves of potato plants by enzyme linked immunosorbition assay. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 157-164.
- Chartier P.** (1966). Etude théorique de l'assimilation brute de la feuille. *Annales de Physiologie Végétale*, **8**: 167-196.
- Chartier P., Bethenod O.** (1977). La productivité primaire à l'échelle de la feuille. *In* Les processus de la production végétale primaire. A. Moyse Eds. Gaultier Villars. Paris. pp 77-112.
- Chazdon R.L., Kaufmann S.** (1993). Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. *Functional Ecology*, **7**: 385-394.
- Combes D., Sinoquet H., Varlet-Grancher C.** (2000). Preliminary measurements and simulation of the spatial distribution of the morphogenetically active radiation (MAR) within an isolated tree canopy. *Annales des Sciences Forestières*, **57**: 497-511.
- Cowan I.R.** (1986). Economics of carbon fixation in higher plants. *In* On the economy of plant form and function. T. J. Givnish Eds. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 133-170.
- Daley P.F., Raschke K., Ball J.T., Berry J.A.** (1989). Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, **90**: 1233-1238.
- Delfine S., Alvino A., Villani M.C., Loreto F.** (1999). Restriction to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiology*, **119**: 1101-1106.
- Delfine S., Alvino A., Zacchini M., Loreto F.** (1998). Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 395-402.

- Di Marco G., Manes F., Tricoli D., Vitale E.** (1990). Fluorescence parameters measured concurrently with net photosynthesis to investigate chloroplastic CO₂ concentration in leaves of *Quercus ilex* L. *Journal of Plant Physiology*, **136**: 538-543.
- Downton W.J.S., Loveys B.R., Grant W.J.R.** (1988a). Non uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytologist*, **110**: 503-509.
- Downton W.J.S., Loveys B.R., Grant W.J.R.** (1988b). Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photosynthesis by abscisic acid. *New Phytologist*, **108**: 263-266.
- Duranceau M., Ghashghaie J., Badeck F.W., Deleens E., Cornic G.** (1999). $\delta^{13}\text{C}$ of CO₂ respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L. under progressive drought. *Plant Cell Environment*, **22**: 515-523.
- Egorov V.P., Karpushkin L.T.** (1988). Determination of air humidity over evaporating surface inside a leaf by a compensation method. *Photosynthetica*, **22**: 394-404.
- Epron D., Godard D., Cornic G., Genty B.** (1995). Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant Cell Environment*, **18**: 43-51.
- Esau K.** (1965). Chapter 16 : The leaf. In *Plant anatomy*. Eds. Wiley. New York. pp 411-435.
- Evans J., Von Caemmerer S., Setchell B., Hudson G.** (1994). The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology*, **21**: 475-495.
- Evans J.R.** (1999). Leaf anatomy enables more equal access to light and CO₂ between chloroplasts. *New Phytologist*, **143**: 93-104.
- Evans J.R., Loreto F.** (2000). Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves. In *Photosynthesis : Physiology and Metabolism*. R. C. Leegood, T. D. Sharkey et S. Von Caemmerer Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp 321-351.
- Evans J.R., Sharkey T.D., Berry J.A., Farquhar G.D.** (1986). Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **13**: 281-292.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T.** (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 503-537.

- Farquhar G.D., O'Leary J.W., Berry J.A.** (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, **9**: 121-137.
- Farquhar G.D., Richard R.A.** (1984). Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, **11**: 539-552.
- Farquhar G.D., Von Caemmerer S.** (1982). Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In *Physiological plant ecology II*. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond et H. Ziegler Eds. Springer Verlag. Heidelberg. pp 550-587.
- Farquhar G.D., Von Caemmerer S., Berry J.A.** (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, **149**: 78-90.
- Field C.B., Ball T.J., Berry J.A.** (1989). Photosynthesis : principles and field techniques. In *Plant physiological ecology : field methods and instrumentation*. R. W. Pearcy, J. R. Ehleringer, H. A. Mooney et P. W. Rundel Eds. Chapman and Hall. London. pp 209-253.
- Frak E., Le Roux X., Millard P., Dreyer E., Jaouen G., Saint-Joanis B., Wendler R.** (2001). Changes in total leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant Cell Environment*, **24**: 1279-1288.
- Furukawa A., Park S.I., Fujinuma Y.** (1990). Hybrid poplar stomata unresponsive to changes in environmental conditions. *Trees*, **4**: 191-197.
- Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R.** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *990*: 87-92.
- Genty B., Goulas Y., Dimon B., Peltier G., Briantais J.-M., Moya I.** (1992). Modulation of efficiency of primary conversion in leaves, mechanism involved at PS2. In *IXth International Congress on Photosynthesis*, Japan. N. Murata Eds. Kluwer Academic Publisher. pp 603-610.
- Genty B., Harbinson J.** (1996). Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. In *Photosynthesis and the environment*. N. R. Baker Eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 67-99.
- Genty B., Meyer S.** (1994). Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 277-284.
- Ghashghaie J., Duranceau M., Badeck F.W., Cornic G., Adeline M.T., Deleens E.** (2001). $\delta^{13}\text{C}$ of CO₂ respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf metabolites : comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell Environment*, **24**: 505-515.

- Gillon J.S., Yakir D.** (2000). Internal conductance to CO₂ diffusion and C¹⁸O discrimination in C₃ leaves. *Plant Physiology*, **123**: 201-213.
- Gimmler H., Weiss C., Baier M., Hartung W.** (1990). The conductance of the plasmalemma for CO₂. *Journal of Experimental Botany*, **41**: 785-795.
- Grace J.** (1989). Measurement of wind speed near vegetation. In *Plant physiological ecology : field methods and instrumentation*. R. W. Pearcy, J. R. Ehleringer, H. A. Mooney et P. W. Rundel Eds. Chapman and Hall. London. pp 57-73.
- Grignon C., Sentenac H.** (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 103-128.
- Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C.** (1977). Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes : effect of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *Journal of General Physiology*, **69**: 779-794.
- Habash D.Z., Paul M.J., Parry M.A.J., Keys A.J., Lawlor D.W.** (1995). Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated CO₂ : the relationship between electron transport and carbon metabolism. *Planta*, **197**: 482-489.
- Harley P.C., Loreto F., Di Marco G., Sharkey T.D.** (1992a). Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology*, **98**: 1429-1436.
- Harley P.C., Sharkey T.D.** (1991). An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂ : reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research*, **27**: 169-178.
- Harley P.C., Thomas R.B., Reynolds J.F., Strain B.R.** (1992b). Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO₂. *Plant Cell Environment*, **15**: 271-282.
- Haupt W.** (1982). Light mediated movement of chloroplasts. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **33**: 205-233.
- Haupt W., Scheuerlein R.** (1990). Chloroplast movement. *Plant Cell Environment*, **13**: 595-614.
- Hopkins W.G.** (1995). Introduction to plant physiology. John Wiley and Sons. New York.
- Jarman P.D.** (1974). The diffusion of carbon dioxide and water vapour through stomata. *Journal of Experimental Botany*, **25**: 927-936.
- Jarvis P.** (1971). The estimation of resistances to carbon dioxide transfer. In *Plant photosynthetic production : manual of methods*. Eds. Dr. Junk N.V. Publishers. The Hague. pp 566-631.

- Joyard J., Teyssier E., Miège C., Berny-Seigneurin D., Maréchal E., Block M.A., Dorne A.J., Rolland N., Ajlani G., Douce R.** (1998). The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiology*, **118**: 715-723.
- Kappel F., Flore J.A.** (1983). Effect of shade on photosynthesis, specific leaf weight, leaf chlorophyll content, and morphology of young peach trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **108**: 541-544.
- Kelly C.K., Beerling D.J.** (1995). Plant life form, stomatal density and taxonomic relatedness : a reanalysis of Salisbury (1927). *Functional Ecology*, **9**: 422-431.
- Krömer S.** (1995). Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**: 45-70.
- Laing W.A., Ogren W.L., Hageman R.H.** (1974). Regulation of Soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, **54**: 678-685.
- Laisk A.K.** (1977). Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C₃ plants [traduit du Russe]. Nauka. Moscow.
- Laisk A.K., Loreto F.** (1996). Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, **110**: 903-912.
- Laisk A.K., Sumberg A.** (1994). Partitioning of the leaf CO₂ exchange into components using CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Physiology*, **106**: 689-695.
- Lauteri M., Scartazza A., Guido M.C., Brugnoli E.** (1997). Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology*, **11**: 675-683.
- Lawlor D.** (1993). Photosynthesis : Molecular, physiological, and environmental processes. Longman Scientific and Technical. Harlow.
- Le Roux X., Bariac T., Sinoquet H., Genty B., Piel C., Mariotti A., Girardin C., Richard P.** (2001a). Spatial distribution of leaf water-use efficiency and carbon isotope discrimination within an isolated tree crown. *Plant Cell Environment*, **24**: 1021-1032.
- Le Roux X., Grand S., Dreyer E., Daudet F.A.** (1999a). Parameterization and testing of a biochemically based photosynthesis model for walnut (*Juglans regia*) trees and seedlings. *Tree Physiology*, **19**: 481-492.

- Le Roux X., Sinoquet H., Vandame M.** (1999b). Spatial distribution of leaf dry weight per area and leaf nitrogen concentration in relation to local radiation regime within an isolated tree crown. *Tree Physiology*, **19**: 181-188.
- Le Roux X., Walcroft A.S., Daudet F.A., Sinoquet H., Chaves M.M., Rodriguez A., Osorio L.** (2001b). Photosynthetic light acclimation in peach leaves : importance of changes in mass:area ratio, nitrogen concentration and leaf nitrogen partitioning. *Tree Physiology*, **21**: 377-386.
- Leuning R.** (1983). Transport of gases into leaves. *Plant Cell Environment*, **6**: 181-194.
- Leuning R.** (1997). Scaling to a common temperature improves the correlation between the photosynthesis parameters J_{\max} and V_{\max} . *Journal of Experimental Botany*, **48**: 345-347.
- Lloyd J., Syvertsen J.P., Kriedemann P.E., Farquhar G.D.** (1992). Low conductances for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell Environment*, **15**: 873-899.
- Loreto F., Di Marco G., Tricoli D., Sharkey T.D.** (1994). Measurement of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynthesis Research*, **41**: 397-403.
- Loreto F., Harley P.C., Di Marco G., Sharkey T.D.** (1992). Estimation of mesophyll conductance by three different methods. *Plant Physiology*, **98**: 1437-1443.
- Mason E.A., Marrero T.R.** (1970). The diffusion of atoms and molecules. *Advanced Atomic and Molecular Physics*, **6**: 155-232.
- Meyer S., Genty B.** (1998). Mapping intercellular CO₂ mole fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging : significance of C_i estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiology*, **116**: 947-957.
- Miyazawa S.-I., Terashima I.** (2001). Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii* : relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate. *Plant Cell Environment*, **24**: 279-291.
- Monteith J.L.** (1973). Principles of environmental physics. Edward Arnold. London.
- Moroney J.V., Bartlett S.G., Samuelsson G.** (2001). Carbonic anhydrase in plants and algae. *Plant Cell Environment*, **24**: 141-153.
- Mott K.A.** (1995). Effects of patchy stomatal closure on gas exchange measurements following abscisic acid treatment. *Plant Cell Environment*, **18**: 1291-1300.
- Mott K.A., Cardon Z.G., Berry J.A.** (1993). Asymmetric patchy stomatal closure for the two surface of *Xanthium strumarium* L. leaves at low humidity. *Plant Cell Environment*, **16**: 25-34.

- Mott K.A., Gibson A.C., O'Leary J.W.** (1982). The adaptative significance of amphistomatic leaves. *Plant Cell Environment*, **5**: 455-460.
- Mott K.A., O'Leary J.W.** (1984). Stomatal behavior and CO₂ exchange characteristics in amphistomatous leaves. *Plant Physiology*, **74**: 47-51.
- Mott K.A., Parkhurst D.F.** (1991). Stomatal response to humidity in air and helox. *Plant Cell Environment*, **14**: 509-515.
- Niinemets Ü., Olevi K., Tenhunen J.D.** (1998). An analysis of light effects on foliar morphology, physiology and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiology*, **18**: 681-696.
- Nishio J.N., Sun J., Vogelmann T.C.** (1993). Carbon fixation gradient across spinach leaves do not follow internal light gradients. *Plant Cell*, **5**: 953-961.
- Nobel P.** (1991). Physicochemical and environmental plant physiology. Academic Press. San Diego.
- Pachepsky L.B., Haskett J.D., Acock B.** (1995). A two-dimensional model of leaf gas exchange with special reference to leaf anatomy. *Journal of Biogeography*, **22**: 209-214.
- Parkhurst D.** (1994). Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist*, **126**: 449-479.
- Parkhurst D.F.** (1986). Internal leaf structure : a three-dimensional perspective. In One the economy of plant form and function. T. J. Givnish Eds. Cambridge University Press. New-York. pp 215-249.
- Parkhurst D.F., Chin Wong S., Farquhar G.D., Cowan I.R.** (1988). Gradient of intercellular CO₂ levels across the leaf mesophyll. *Plant Physiology*, **86**: 1032-1037.
- Parkhurst D.F., Mott K.A.** (1990). Intercellular diffusion limits to CO₂ uptake in leaves : studies in air and helox. *Plant Physiology*, **94**: 1024-1032.
- Parkinson K.J.** (1985). A simple method for determining the boundary layer resistance in leaf cuvettes. *Plant Cell Environment*, **8**: 223-226.
- Peltier G., Cournac L., Despax V., Dimon B., Fina L., Genty B., Rumeau D.** (1995). Carbonic anhydrase activity in leaves as measured in vivo by ¹⁸O exchange between carbon dioxide and water. *Planta*, **196**: 732-739.
- Pfanz H.** (1995). Apoplastic and symplastic proton concentrations and their significance for metabolism. In Ecophysiology of photosynthesis. M. M. C. E.D. Schulze Eds. Springer Verlag. pp 103-122.
- Pfanz H., Dietz K.J.** (1986). A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues. *Journal of Plant Physiology*, **129**: 41-48.

- Price G.D., Von Caemmerer S., Evans J.R., Yu J.W., Lloyd J., Oja V., Kell P., Harrison K., Gallagher A., Badger M.R.** (1994). Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants have a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta*, **193**: 331-340.
- Prioul J.L., Chartier P.** (1977). Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation : a critical analysis of the method used. *Annals of Botany*, **41**: 789-800.
- Psaras G.K.** (1986). Chloroplast arrangement along intercellular spaces in the leaves of a mediterranean subshrub. *Journal of Plant Physiology*, **126**: 189-193.
- Psaras G.K., Diamantopoulos G.S., Makripoulas C.P.** (1996). Chloroplast arrangement along intercellular air spaces. *Israel Journal of Plant Sciences*, **44**: 1-9.
- Rand R.H.** (1978). A theoretical analysis of CO₂ absorption in sun versus shade leaves. *Journal of Biomechanical Engineering*, **100**: 20-24.
- Raschke K., Patzke J., Daley P.F., Berry J.A.** (1990). Spatial and temporal heterogeneities of photosynthesis detected through analysis of chlorophyll fluorescence images of leaves. In Current research in photosynthesis. M. Baltscheffsky Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrech, The Netherlands. pp 573-578.
- Renou J.-L., Gerbaud A., Just D., André M.** (1990). Differing substomatal and chloroplastic CO₂ concentrations in water-stressed Wheat. *Planta*, **182**: 415-419.
- Ridolfi M., Dreyer E.** (1997). Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana x trichocarpa* cv Peace). II. Consequences for photosynthetic carbon assimilation. *New Phytologist*, **135**: 31-40.
- Ridolfi M., Fauveau M.L., Label P., Garrec J.P., Dreyer E.** (1996). Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana x trichocarpa* cv Peace). I. Stomatal function. *New Phytologist*, **134**: 445-454.
- Rumeau D., Cuiné S., Fina L., Gault N., Nicole M., Peltier G.** (1996). Subcellular distribution of carbonic anhydrase in *Solanum tuberosum* L. leaves. *Planta*, **199**: 79-88.
- Saradadevi K., Raguavendra A.S.** (1992). Dark respiration protects photosynthesis against photoinhibition in mesophyll protoplasts of Pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology*, **99**: 1232-1237.
- Scartazza A., Lauteri M., Guido M.C., Brugnoli E.** (1998). Carbon isotope discrimination in leaf stem sugars, water-use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 489-498.

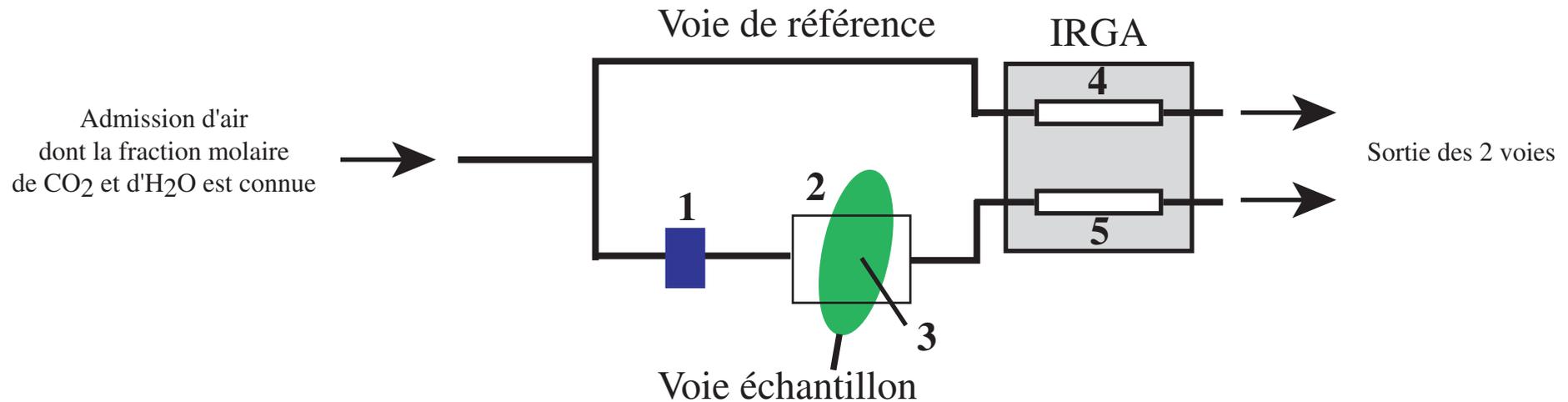
- Sharkey T.D.** (1985). Photosynthesis of intact leaves of C3 plants : physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review*, **51**: 53-105.
- Sharkey T.D., Imai K., Farquhar G.D., Cowan I.R.** (1982). A direct confirmation of the standard method of estimating intercellular partial pressure of CO₂. *Plant Physiology*, **69**: 657-659.
- Sharkey T.D., Raschke K.** (1981). Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology*, **68**: 1170-1174.
- Stadelmann E.J.** (1977). Passive transport parameters of plant cell membranes. In Regulation of cell membrane activities in plants. E. Marre et O. Ciferri Eds. Elsevier. Amsterdam. pp 3-18.
- Stumm W., Morgan J.J.** (1996). Chapter 4 : Dissolved carbon dioxide. In Aquatic chemistry. Eds. John Wiley and Sons. New York. pp 148-204.
- Sültemeyer D.F., Rinast K.A.** (1996). The CO₂ permeability of the plasma membrane of *Chlamydomonas reinhardtii* : mass spectrometric ¹⁸O exchange from ¹³C¹⁸O₂ in suspensions of carbonic anhydrase-loaded plasma membrane vesicles. *Planta*, **200**: 358-368.
- Sumberg A., Laisk A.K.** (1995). Measurements of the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves. In Photosynthesis : from light to biosphere. P. Mathis Eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 615-618.
- Syvertsen J.P., Lloyd J., McConchie C., Kriedemann P.E., Farquhar G.D.** (1995). On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environment*, **18**: 149-157.
- Terashima I.** (1989). Productive structure of a leaf. In Photosynthesis. W. R. Briggs Eds. Alan R Liss. New-York. pp 207-226.
- Terashima I.** (1992). Anatomy of non uniform leaf photosynthesis. *Photosynthesis Research*, **31**: 195-212.
- Terashima I., Miyazawa S.-I., Hanba Y.T.** (2001). Why sun leaves thicker than shade leaves ? Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. *Journal of plant Research*, **114**: 93-105.
- Terashima I., Saeki T.** (1983). Light environment within a leaf. I. Optical properties of paradermal sections of *Camelia* leaves with special reference to difference in the optical properties of palisade and spongy tissues. *Plant and Cell Physiology*, **24**: 1493-1501.
- Terashima I., Wong S.C., Osmond C.B., Farquhar G.D.** (1988). Characterisation of non-uniform photosynthesis induced by abscissic acid in leaves having different mesophyll anatomies. *Plant Cell Physiology*, **29**: 385-394.

- Ustin S., Jacquemoud S., Govaerts Y.** (2001). Simulation of photon transport in a three-dimensional leaf : implications for photosynthesis. *Plant Cell Environment*, **24**: 1095-1103.
- Villar R., Held A.A., Merino J.** (1994). Comparison of methods to estimate dark respiration in the light in leaves of two woody species. *Plant Physiology*, **105**: 167-172.
- Vogelmann T., Martin G.** (1993). The functional significance of palisade tissue : penetration of directional versus diffusive light. *Plant Cell Environment*, **16**: 65-72.
- Von Caemmerer S.** (2000). Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO Publishing. Collingwood.
- Von Caemmerer S., Evans J.R.** (1991). Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **18**: 287-305.
- Von Caemmerer S., Evans J.R., Hudson G.S., Andrews T.J.** (1994). The kinetics of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in vivo inferred from measurements of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco. *Planta*, **195**: 88-97.
- Von Caemmerer S., Farquhar G.D.** (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, **153**: 376-387.
- Whitney S.M., Von Caemmerer S., Hudson G.S., Andrews T.J.** (1999). Direct mutation of the Rubisco large subunit of Tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiology*, **121**: 579-588.
- Wullschlegel S.D.** (1993). Biochemical limitation to carbon assimilation in C₃ plants : a retrospective analysis of the A/C_i curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany*, **44**: 907-920.
- Yeoh H.H., Badger M.R., Watson L.** (1980). Variations in K_m(CO₂) of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase among grasses. *Plant Physiology*, **66**: 1110-1112.
- Yeoh H.H., Badger M.R., Watson L.** (1981). Variations in kinetic properties of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase among plants. *Plant Physiology*, **67**: 1151-1155.

ANNEXE I

Dispositifs couplant échanges gazeux et
fluorescence chlorophyllienne

Figure A1.1 : Principe de fonctionnement d'un dispositif d'échanges gazeux en système ouvert. Un flux de gaz est divisé en deux voies : une voie de référence, et une voie "échantillon". L'air de la voie de référence n'est pas modifié, tandis que l'air de la voie échantillon se trouve enrichi en vapeur d'eau et appauvri en CO₂ après avoir circulé dans la chambre foliaire. Un analyseur infra-rouge (IRGA) travaillant en différentiel, permet de déterminer la différence de fraction molaire de CO₂ et d'H₂O entre les deux cellules d'analyse.



- 1 : débitmètre
- 2 : feuille insérée dans la chambre d'échanges gazeux, thermostatée et ventilée
- 3 : Dispositif d'estimation de la température foliaire (eg. thermocouple)
- 4 : Cellule d'analyse infra-rouge de la voie de référence
- 5 : Cellule d'analyse infra-rouge de la voie échantillon

AI.1: Principe d'un système ouvert d'échanges gazeux

Cette technique permet une quantification des échanges de CO₂ (assimilation et respiration) et de vapeur d'eau (transpiration).

Les propriétés optiques d'absorption dans l'infra-rouge du CO₂ et de la vapeur d'eau permettent d'estimer leurs fractions molaires dans un mélange gazeux circulant dans la cellule d'un analyseur infra-rouge (IRGA : Infra-Red Gas Analyser). Un système ouvert d'échanges gazeux est composé de deux voies : une voie de référence, et une voie "échantillon" (*cf.* figure A1.1). L'air de la voie de référence est directement dirigé vers une des deux cellules d'analyse de l'IRGA ("cellule de référence"), tandis que l'air de la voie "échantillon" circule par un débitmètre puis dans une chambre contenant une feuille (ou une fraction de la surface d'une feuille). Un système de mesure de température (le plus souvent un thermocouple) placé dans la chambre permet une mesure de la température foliaire. Les fractions molaires de vapeur d'eau et de CO₂ de l'air provenant d'une part de la voie de référence, et d'autre part de la voie "échantillon" sont estimés par l'IRGA. On considère que le gaz parvenant à la cellule de référence a la même composition que le gaz entrant dans la chambre foliaire, et que le gaz de la cellule "échantillon" a la même composition que le gaz entourant la feuille dans la chambre d'échanges gazeux.

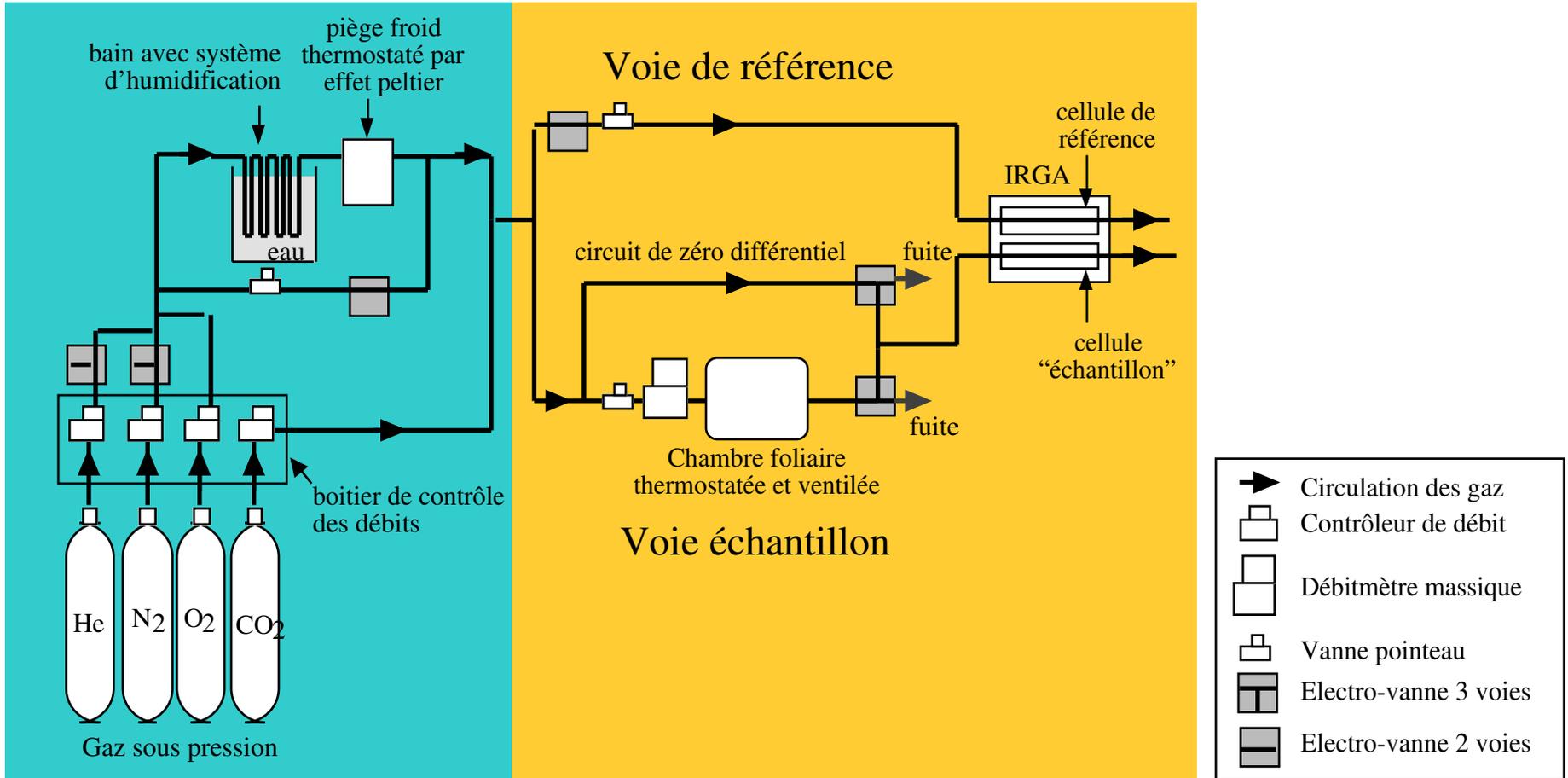
AI.2 □ Montage couplant échanges gazeux et imagerie de fluorescence chlorophyllienne

Ce système a été conçu pour mesurer les échanges gazeux dans l'air, l'azote, l'hélium et l'hélox.

AI.2.2 : Descriptif du montage d'échanges gazeux

Les échanges gazeux de vapeur d'eau et de CO₂ entre la feuille et l'atmosphère sont mesurés grâce à un système ouvert (*cf.* description dans la figure A1.2), utilisant un IRGA différentiel (Licor 6262, Licor Inc., Lincoln, USA). Le mélange gazeux est réalisé à partir d'alimentations séparées en N₂, He, O₂ purs, et en CO₂ (CO₂ pur, ou à 15 % dans N₂) dont les débits sont fixés par des contrôleurs de débit massiques (Brooks 5850-E et Tylan FC-260). Le

Figure A1.2 : Schéma du montage expérimental de mesure des échanges gazeux en circuit ouvert. Le système de conditionnement des gaz permet de générer de l'air, de l'azote, de l'hélium et de l'hélium à partir de gaz purs sous pression. Le mélange gazeux est ensuite humidifié, puis du CO₂ est ajouté. Le mélange gazeux ainsi préparé est dirigé vers le système d'analyse, fonctionnant sur le même principe que celui détaillé dans la figure A1.1.



*Conditionnement
des gaz*

Analyse

mélange primaire, ou gaz vecteur (N_2 , air: N_2/O_2 79/21, hélox: He/O_2 79/21 ou He) est saturé en vapeur d'eau par passage dans un échangeur de vapeur d'eau, puis refroidi à une température de point de rosée donnée dans un échangeur thermique thermostaté par effet Peltier. Une fois l'humidification réalisée, le CO_2 est ajouté au mélange qui est ensuite conduit pour un tiers vers la chambre foliaire et la cellule "échantillon" de l'IRGA. Le débit est mesuré avant l'entrée du gaz dans la chambre foliaire par un débitmètre massique de précision à faible perte de charge (Bronkhorst High-Tech F101D). Le second tiers du flux du mélange gazeux est directement conduit vers l'IRGA et sert de référence. Le dernier tiers du flux permet de "court-circuiter" la chambre et est utilisé pour mesurer un zéro différentiel en cours d'expérimentation. Les matériaux du circuit ont été choisis pour leur faible réactivité avec les gaz véhiculés (faible adsorption de la vapeur d'eau). La longueur des tuyaux dans chacune des branches a été ajustée pour égaliser leur volume, afin que les deux cellules de l'IRGA travaillent en mode différentiel vrai. Les fractions molaires de CO_2 et de vapeur d'eau dans les différents mélanges gazeux sont calculées à partir du signal brut du détecteur de l'IRGA (en mV) grâce à un programme écrit sous Labview (National Instrument, USA). Les équations données pour l'analyseur Licor 6262 sont conçues pour calculer à partir du signal du détecteur les fractions molaires avec l'air comme gaz vecteur, et il est nécessaire d'apporter une correction pour les autres mélanges gazeux (N_2 , He et Hélox) qui modifient la relation entre signal de sortie (absorption dans l'infra-rouge) et fractions molaires de CO_2 et de vapeur d'eau. Les étalonnages qui ont été réalisés pour chacun des mélanges gazeux ainsi que les correctifs apportés aux équations permettant de calculer les fractions molaires de CO_2 et de la vapeur d'eau sont décrites dans l'annexe II. Les différentiels d'absorption mesurés par le Licor 6262 sont suivis en continu sur un enregistreur graphique.

AI.2.3 : Calibration du Licor-6262

Les zéros pour le CO_2 et la vapeur d'eau sont obtenus en faisant circuler de l'air dans deux colonnes de chaux sodée puis deux colonnes de perchlorate de magnésium anhydre (Sigma Chemicals), puis de diriger le flux obtenu dans les deux cellules de l'IRGA.

Le gain pour le CO_2 est réalisé immédiatement après les zéros grâce à une bouteille d'air étalon (L'air Liquide). Afin d'économiser le gaz de l'étalon, un étalon secondaire a fréquemment été utilisé la fraction molaire de CO_2 d'une bouteille d'air comprimé (L'Air Liquide, qualité U) a été déterminée grâce au Licor-6262 (immédiatement après sa calibration

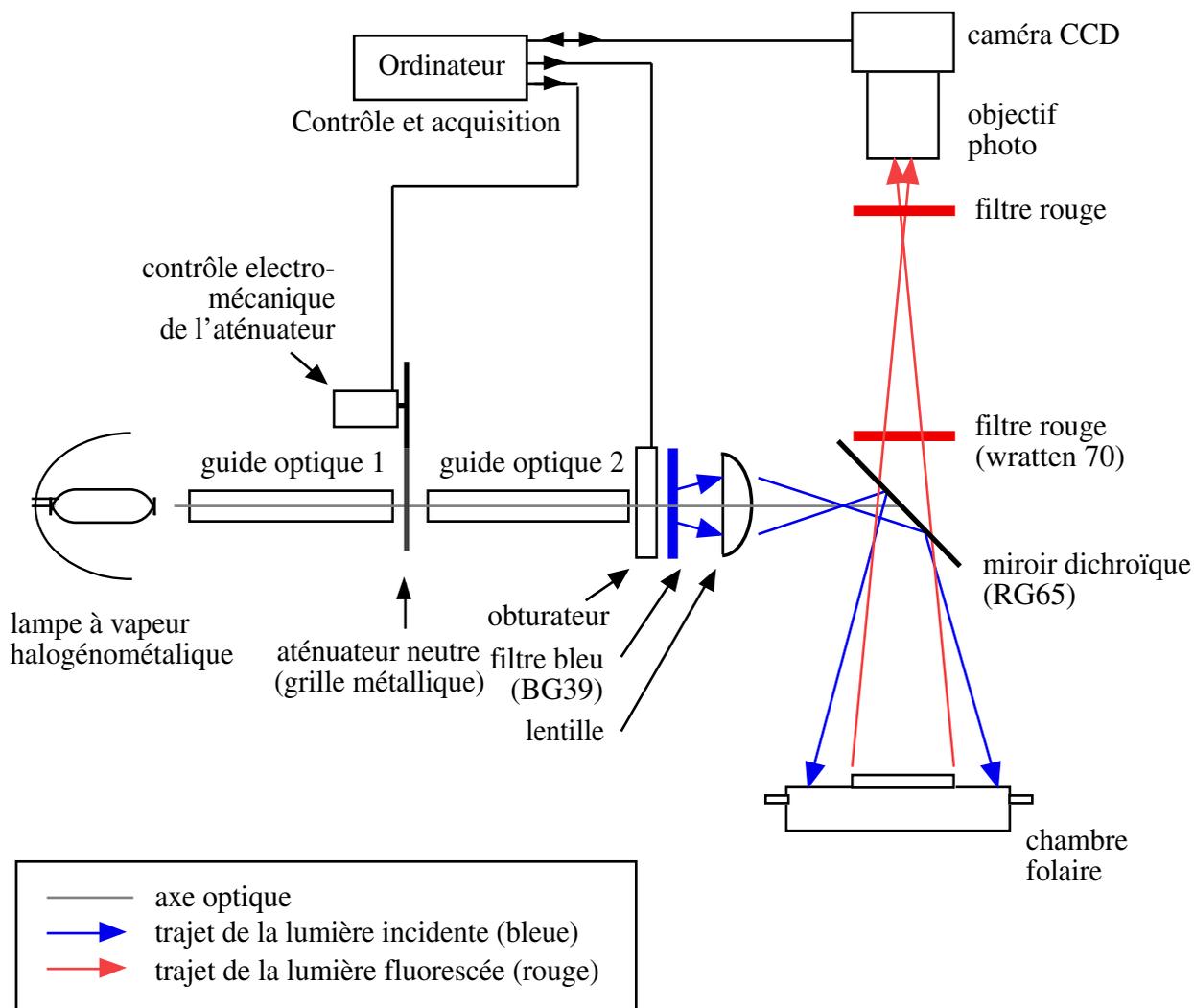
avec l'étalon primaire), puis cette bouteille a servi d'étalon secondaire. Le gain pour la vapeur d'eau a été réalisé à l'aide d'un générateur de point de rosée, permettant de faire circuler dans les cellules de l'IRGA un air ayant une température de point de rosée connue (pour nos expérimentations $T_{dP}=17^{\circ}\text{C}$, et circulation du gaz pendant au moins une heure).

Remarque : une seule calibration dans l'air est nécessaire pour que l'instrument soit calibré pour tous les mélanges gazeux (air, azote, hélium et hélium, cf. annexe II).

AI.2.4 : Chambre foliaire

La feuille ou la foliole est placée dans une chambre foliaire en aluminium nickelé, thermostatée et ventilée, fabriquée pendant mon DEA. La ventilation est conçue de manière à être suffisamment forte pour obtenir une conductance de couche limite élevée afin de limiter l'influence d'une erreur dans l'estimation de cette conductance sur le calcul de la conductance stomatique. La régulation thermique est assurée par un échangeur thermique thermostaté par effet peltier, refroidi par circulation d'eau et placé sur la partie inférieure de la chambre. Un matériau conducteur de chaleur a été placé entre la partie supérieure et la partie inférieure de la chambre, afin d'y établir un bon contact thermique. La plupart des parties métalliques externes de la chambre sont recouvertes de mousse polystyrène afin de l'isoler thermiquement de l'air ambiant. L'étanchéité de la chambre est assurée par des joints de néoprène traités à la vaseline ou à la paraffine, pour minimiser l'adsorption de vapeur d'eau, et par une fermeture centrale à vis qui assure une répartition homogène des forces de serrage. Un système de recirculation autour de la chambre des gaz provenant de la cellule de référence a été mis au point. Ce système visant à réduire le gradient de pression partielle de CO_2 entre l'intérieur de la chambre et l'extérieur (et donc de minimiser la diffusion par les joints de la chambre) est décrit dans l'annexe III. La face supérieure de la chambre (permettant de voir la face adaxiale de la feuille) possède une fenêtre de 2,5*2,5 cm en film polypropylène traité pour minimiser l'adsorption de vapeur d'eau (Propafilm 250-01885, Licor Inc.). Elle est utilisée pour l'illumination par de la lumière bleue et la mesure de fluorescence chlorophyllienne. La fenêtre inférieure est en séléniure de Zinc (II-VI, USA). Ce matériau possédant une transmittance très élevée dans l'infra-rouge thermique est utilisé pour la mesure infra-rouge de température foliaire (cf. annexe IV). Dans nos expériences, le débit gazeux à l'entrée de la chambre est d'environ $0,5 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Figure A1.3 : Principe de fonctionnement du dispositif d'imagerie de la fluorescence chlorophyllienne. La feuille est éclairée avec de la lumière bleue, et la fluorescence rouge est analysée par une caméra CCD. Le flash saturant est fourni en levant l'aténuateur. Un descriptif exhaustif de ce dispositif est disponible dans Genty & Meyer, 1995.



Imagerie de fluorescence chlorophyllienne

Le dispositif d'échanges gazeux décrit ci-dessus est couplé à un dispositif d'imagerie de la fluorescence chlorophyllienne. Ce système permet de mesurer la répartition du Φ_{PSII} sur toute la surface abaxiale de la feuille dont on mesure les échanges gazeux. La feuille est illuminée par de la lumière bleue (filtre Schott BG39). La fluorescence est mesurée dans le rouge / rouge lointain ($\lambda > 665$ nm) (filtre Schott BG665, Wratten 70, Balzers R665). Le principe de fonctionnement de ce système est schématisé dans la figure A1.3 (*cf.* Genty et Meyer, 1994 pour une description complète du dispositif).

AI.3 \square Montages couplant Licor-6400 et fluorescence chlorophyllienne

Ce dispositif reposant sur deux appareils commerciaux présente l'avantage d'être d'un usage beaucoup plus simple et rapide que celui décrit précédemment, et d'être utilisable sur le terrain. Toutefois, il présente les inconvénients de ne pas être adapté à l'utilisation de mélanges gazeux à base d'hélium, et de ne pas autoriser la détection des situations d'ouverture stomatique hétérogène.

AI.3.1 : Principe de fonctionnement du Licor-6400

Le Licor-6400 (Licor Inc., Lincoln, USA) est un système commercial portable d'échanges gazeux en circuit ouvert. La principale différence avec le système d'échanges gazeux présenté précédemment est que les analyseurs sont disposés dans la chambre de mesure. D'autre part, le Licor-6400 ne repose pas sur un IRGA différentiel, mais sur deux IRGA travaillant en absolu. Un dispositif permettant de faire circuler les gaz provenant de la cellule échantillon vers la cellule de référence (mode "Match"), et d'égaliser à intervalles réguliers la réponse des deux IRGA, permet de s'affranchir de leur dérive.

Plusieurs types de chambres foliaires sont adaptables sur cet appareil en fonction de la qualité de l'éclairage voulue. Deux chambres commerciales ont été utilisées \square une chambre utilisant un éclairage par des diodes électroluminescentes (DEL) rouges (Ref. 6400-02, pic

d'émission entre 665 et 675 nm), et une chambre utilisant à la fois des diodes bleue et rouges (Ref. 6400-02B, pics d'émission à $\lambda = 470 \pm 10$ et 665 ± 10 nm). Deux prototypes de chambre permettant une mesure simultanée des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne ont été construits par Bernard Genty. La surface foliaire dans les chambres est de 6.25 cm^2 . La température foliaire est estimée à l'aide d'un thermocouple maintenu contre la face abaxiale. La conductance de couche limite pour la vapeur d'eau a été estimée par le constructeur.

Plusieurs expérimentations réalisées avec de faibles pressions partielles de CO_2 dans la chambre ont montré que le CO_2 est susceptible de diffuser dans les joints enserrant la feuille depuis l'atmosphère ambiante vers la chambre suivant le gradient de pression partielle. Un dispositif original a été conçu pour éviter cette diffusion, et est décrit dans l'annexe III.

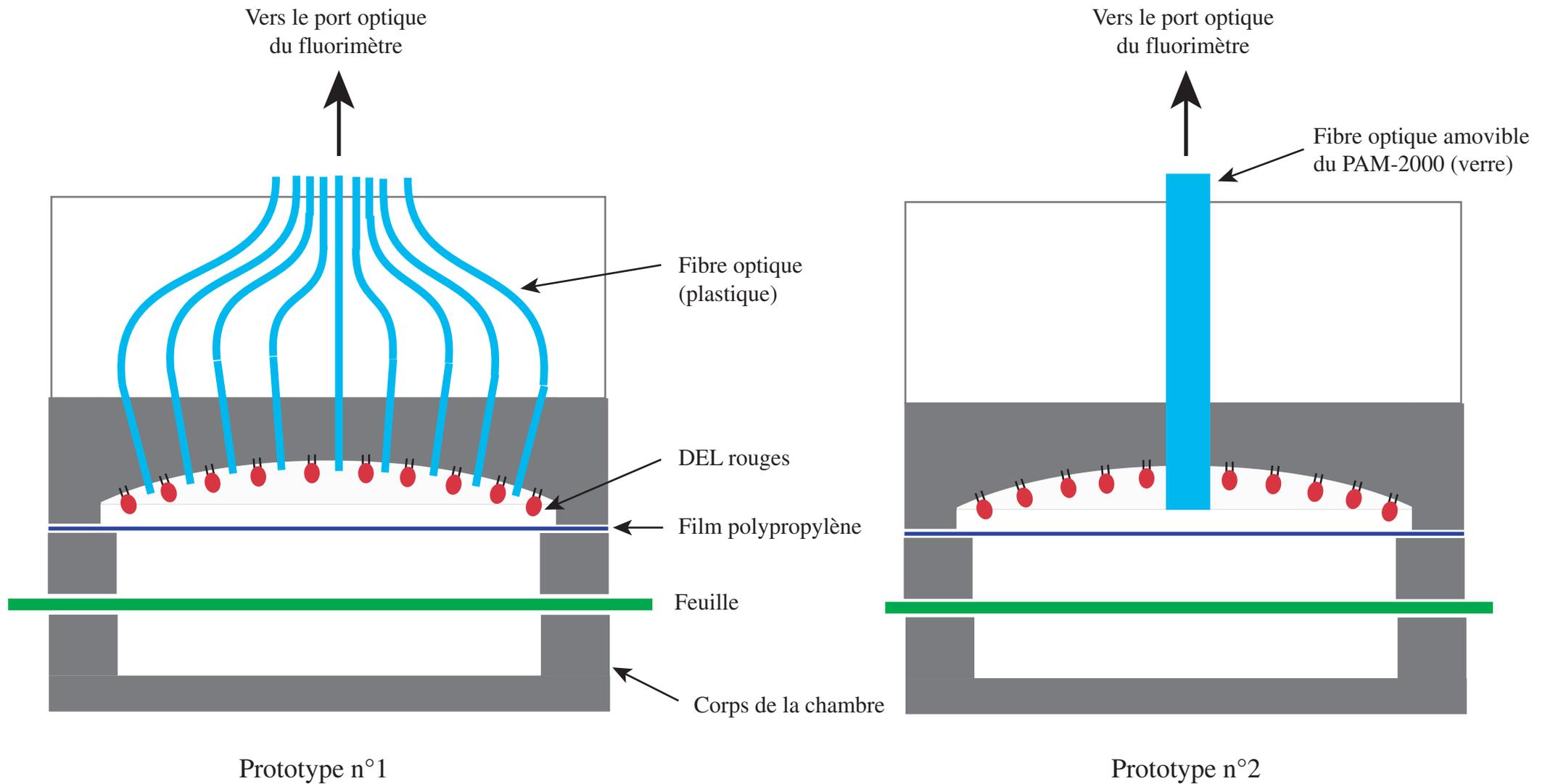
AI.3.2 : Couplage avec un fluorimètre modulé

La mesure de fluorescence est effectuée grâce à un fluorimètre modulé (PAM-2000 ou Mini-PAM, Walz GmbH, Allemagne). Les fluorimètres classiques comme celui utilisé pour l'imagerie de fluorescence imposent le plus souvent d'utiliser une gamme de longueur d'onde bien définie pour l'éclairage (de la lumière bleue dans notre cas). Les fluorimètres modulés permettent de s'affranchir de cette contrainte, et d'utiliser n'importe quelle longueur d'onde pour illuminer la feuille. La feuille reçoit deux types d'éclairage : un éclairage non modulé (dont l'intensité et la longueur d'onde peuvent être choisis librement), et un éclairage modulé généré par le fluorimètre (λ environ 650 nm, et fréquence comprise entre 600Hz et 20kHz). Deux signaux de fluorescence foliaire sont transmis au port optique du fluorimètre : un signal non modulé (induit par l'éclairage non modulé), et un signal de fluorescence modulé (induit par l'éclairage modulé du fluorimètre). Le fluorimètre sépare ensuite les deux signaux, et utilise sélectivement la fluorescence modulée pour calculer les rendements de fluorescence comme décrit précédemment.

Deux prototypes de tête foliaires permettant de coupler échanges gazeux et fluorescence ont été construits par Bernard Genty, et sont schématisés dans la figure A1.4 :

(1) Premier prototype : L'éclairage est assuré par des diodes rouges (Stanley KR 5005S, pic d'émission à $\lambda = 663$ nm) placées dans la chambre foliaire. L'illumination par l'éclairage modulé, la mesure de fluorescence ainsi que le flash saturant sont effectués via une unique fibre optique de grand diamètre reliée au port optique d'un PAM-2000 (Walz GmbH,

Figure A1.4 : Vue en coupe des prototypes de chambre foliaire adaptables sur le Licor-6400, et permettant une mesure simultanée des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne. Pour le prototype n°1, le flash saturant est généré par les diodes de la chambre, tandis que pour le prototype n°2, le flash est généré par le fluorimètre, et transmis à la feuille par la fibre optique.



Allemagne). Le flash (d'une durée d'environ 1 sec, et d'intensité supérieure ou égale à $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est généré par une lampe halogène placée dans le boîtier du fluorimètre.

(2) Second prototype □ L'éclairement ainsi que le flash saturant est assuré par des diodes rouges (Stanley KR5005S, pic d'émission à $\lambda=663 \text{ nm}$) dans la chambre foliaire. Des fibres optiques de faible diamètre ont été disposées à intervalle régulier entre les diodes de la tête foliaire, et sont regroupées pour être connectées au port optique d'un Mini-PAM (Walz GmbH, Allemagne). L'éclairement modulé généré par le fluorimètre est transmis à la feuille via les fibres optiques, lesquelles collectent également la fluorescence foliaire.

AI.3.3 : Conditionnement des gaz

Pour la plupart des expérimentations, le Licor-6400 a été alimenté avec de l'air comprimé sans CO_2 . Pour les expérimentations nécessitant de varier la pression partielle d'oxygène, le mélange gazeux a été récréé à l'aide d'alimentations séparées en N_2 , O_2 et CO_2 . Lors de certaines expérimentations nécessitant une faible diminution de la pression partielle ambiante d'oxygène, de l'air comprimé est mélangé à de l'azote pur grâce à deux contrôleurs de débit.

La pression partielle de CO_2 dans la chambre foliaire est contrôlée en piégeant le CO_2 de l'air entré dans la console grâce à une colonne de chaux sodée, puis en injectant du CO_2 pur sous pression grâce à un régulateur de débit. Lors des expérimentations nécessitant de travailler à de faibles pressions partielles de CO_2 (*e.g.* 10 Pa), une bouteille de CO_2 dilué à 15% dans de l'azote a été utilisée.

L'humidification de l'air est obtenue ajoutant de l'eau distillée à la chaux sodée du piège CO_2 du Licor-6400 (environ 5ml d'eau pour une colonne) et en piégeant plus ou moins le flux obtenu grâce à la seconde colonne contenant le dessiccant ("drierite" = sulfate de calcium anhydre) pour obtenir la pression partielle de vapeur d'eau désirée. L'humidification n'altère pas la propriété de piégeage du CO_2 par la chaux sodée. Pour certaines expérimentations, une colonne supplémentaire de chaux sodée (non humidifiée) a été placée avant l'admission des gaz du Licor-6400.

AI.3.4 : Calibration des IRGA du Licor-6400

Le zéro pour le CO_2 est obtenu en faisant circuler de l'azote pur (L'air Liquide, qualité U) dans les deux cellules de l'IRGA. Pour effectuer le zéro pour la vapeur d'eau, il est nécessaire

de faire circuler préalablement l'azote par une colonne de Perchlorate de Magnésium anhydre (Sigma Chemicals, dessiccant plus efficace que la drierite).

Le gain pour le CO₂ est réalisé de la même manière que le Licor-6262 avec l'étalon primaire ou un étalon secondaire. Le gain pour la vapeur d'eau a été réalisé à l'aide d'un "générateur de point de rosée" (dew point generator) Licor-610 (Licor Inc., Lincoln, USA) permettant de faire circuler dans les cellules de l'IRGA un air ayant une température de point de rosée connue (pour nos expérimentations \square TdP=17°C, et circulation du gaz pendant au moins une heure).

ANNEXE II

Correction du signal de l'analyseur Licor 6262,
en vue de son utilisation avec des mélanges
gazeux à base d'hélium

AII.1 : Introduction

L'analyseur infrarouge (IRGA) Licor 6262 permet d'estimer les fractions molaires de CO₂ et d'H₂O dans un mélange gazeux, en mesurant l'absorption du CO₂ et de l'H₂O dans l'infrarouge. La relation entre fraction molaire et absorption doit être corrigée pour un phénomène physique appelé "élargissement de bande" (ou "band-broadening"). Ce phénomène est lié au fait que l'absorption d'un gaz x (*ie.* CO₂ ou H₂O) présent en une faible concentration donnée dans un mélange gazeux, est affectée par les collisions avec les autres molécules du mélange. Ainsi, la bande d'absorption de x devient plus large au fur et à mesure que les pressions partielles des autres constituants du mélange augmente.

L'analyseur Licor-6262 a été conçu pour être utilisé avec l'air comme mélange gazeux, et ne corrige le signal que pour l'effet de band-broadening de la vapeur d'eau sur le CO₂ (l'effet inverse étant négligeable). L'utilisation de gaz vecteurs à base d'hélium lors de cette thèse, nous a conduit à paramétrer pour chaque mélange gazeux les équations d'étalonnage de l'analyseur calculant une fraction molaire à partir du voltage de sortie de l'IRGA. Les équations et les développements présentés ici sont dérivés des équations présentées dans les notices techniques des systèmes d'échanges gazeux Licor-6262 et Licor-6400 (Licor Inc., Lincoln, USA).

AII.2 : Principe de l'estimation des fractions molaires de CO₂ et de vapeur d'eau à partir du signal de l'IRGA

La relation entre la quantité d'un absorbeur x et son absorption, en fonction de la pression atmosphérique, peut être prédite par la relation (Jamieson *et al.*, 1963) :

$$A_x \cdot P^{\square} = g[u_x \cdot P^{\square}] \quad (\text{A2.1})$$

où A_x est l'absorption de x, P est la pression totale, u_x la quantité d'absorbeur (mol.m⁻²), et $g[\]$ est une fonction non définie. u_x peut être exprimé en fonction de la densité molaire de x (\square_x , en mol.m⁻³) et la longueur du trajet optique (L en m) d'après la relation :

$$u_x = \square_x \cdot L \quad (\text{A2.2})$$

Ainsi, la relation (A2.1) peut être réécrite :

$$A_x \cdot P^{\square} = g[\square_x L \cdot P^{\square}] \quad (\text{A2.3})$$

D'après la loi des gaz parfaits, la densité molaire de x peut être exprimée en fonction de sa fraction molaire d'après la relation suivante :

$$\rho_x = \frac{XP}{RT} \quad (\text{A2.4})$$

où X est la fraction molaire de x , R est la constante des gaz parfaits, et T la température. Ainsi, en substituant l'équation (A2.4) dans (A2.3), et en incorporant les constantes R et L dans une nouvelle fonction $h[\]$, il est possible d'écrire :

$$A_x \cdot P^{\square} = h[X \cdot T^{\square}] \quad (\text{A2.5})$$

Cette dernière équation peut être résolue pour X d'après l'équation suivante :

$$X = h^{\square}[A_x \cdot P^{\square}] \cdot T \quad (\text{A2.6})$$

Les IRGA du Licor-6262 délivrent un voltage de sortie (V) proportionnel à A_x , soit :

$$V = KA_x \quad (\text{A2.7})$$

En substituant l'équation (A2.6) dans (A2.5), X peut être exprimé d'après la relation suivante :

$$X = f^{\square} \left[V \frac{P_o^{\square} T}{P^{\square} T_o} \right] \quad (\text{A2.8})$$

où $f[\]$ est une fonction d'étalonnage incluant K , et obtenue à la pression et la température standard ($P_o=101.3$ kPa et $T_o=273$ K). Cette fonction a la forme d'une polynomiale.

L'équation (A2.8) nous permet de décrire deux relations : une pour le CO_2 , et une pour la vapeur d'eau. La fraction molaire de CO_2 est estimée d'après la relation suivante :

$$C = f_c^{\square} \left[V_c \frac{P_o^{\square} T}{P^{\square} T_o} \right] \quad (\text{A2.9})$$

avec C : fraction molaire de CO_2 , V_c voltage de l'IRGA pour le CO_2 , P_o et P respectivement la pression atmosphérique standard et au moment de la mesure, T_o et T respectivement la température standard et celle au moment de la mesure. $f_c[\]$ est une fonction polynomiale d'ordre 3 (déterminée par le constructeur pour le Li-6262 de la première génération).

La fraction molaire de vapeur d'eau est estimée d'après la relation suivante :

$$W = f_w^{\square} \left[V_w \frac{P_o^{\square} T}{P^{\square} T_o} \right] \quad (\text{A2.10})$$

avec : W : fraction molaire de vapeur d'eau, V_w : voltage de l'IRGA pour la vapeur d'eau. $f_w[\]$ est la fonction polynomiale (ordre 3) d'étalonnage pour la vapeur d'eau.

AII.2 : Correction pour le band-broadening

AII.2.1 : Notion de pression équivalente, et équations des analyseurs corrigées pour le band-broadening

L'effet de band-broadening diffère à la fois selon la nature et la pression partielle des gaz purs utilisés dans le mélange gazeux. Le principe de la correction pour le band-broadening conduit à définir le concept de pression équivalente, qui permet de corriger la relation (A2.1) pour la pression. La pression totale d'un mélange gazeux est la somme des pressions partielles de ses constituants, tandis que la pression équivalente peut être définie comme :

$$P_e = \sum a_i P_i = P \cdot \sum a_i X_i \quad (\text{A2.11})$$

où P_e est la pression équivalente, P la pression atmosphérique, P_i et X_i respectivement la pression partielle et la fraction molaire de chaque gaz constituant le mélange, et a_i est la constante (généralement relative à l'azote, soit $a_{N_2} = 1$) pondérant l'effet de band-broadening de chaque gaz. D'une manière générale, on néglige l'effet de band-broadening causé par le CO_2 , car ce gaz est généralement présent en très faible concentration. Par contre, il est indispensable de prendre en compte l'effet de band-broadening par la vapeur d'eau.

La correction du calcul d'une fraction molaire en fonction du voltage de l'IRGA s'effectue ensuite en substituant la pression atmosphérique par la pression équivalente dans les équations (A2.3) et (A2.4). En développant ces deux dernières relations, l'équation de l'analyseur pour le CO_2 , prenant en compte l'effet de band-broadening devient :

$$C = \sum_i f_c \sum_c V_c \frac{P_o \sum T}{P \sum_i \sum T_o} \quad (\text{A2.12})$$

$$\text{avec } \sum_i = \sum a_i X_i$$

Pour la vapeur d'eau, nous avons été amenés à modifier la relation A2.12 (suppression du terme \sum_i avant la fonction f_w) afin de décrire de manière satisfaisante la relation entre voltage de l'IRGA et fraction molaire de vapeur d'eau. On obtient ainsi :

$$W = f_w \sum_w V_w \frac{P_o \sum T}{P \sum_i \sum T_o} \quad (\text{A2.13})$$

AII.2.2 : Détermination de la pression équivalente des gaz du mélange (azote, hélium et héliox)

AII.2.2.1 : Pression équivalente affectant le CO₂

Lors de l'utilisation de mélanges gazeux de composition variable, comme c'est le cas lors de cette thèse, la pression équivalente peut être exprimée d'après la relation :

$$P_e = P(a_w W + \sum a_i X_i) \quad (\text{A2.14})$$

a_w et W étant respectivement le coefficient de band-broadening et la fraction molaire de la vapeur d'eau, a_i et X_i étant respectivement le coefficient de band-broadening et la fraction molaire de chaque gaz considéré dans le mélange (azote, hélium, oxygène). Dans le cas d'un mélange gazeux à base d'azote, dont la fraction molaire d'oxygène peut être variable, l'expression (A2.14) devient :

$$P_e = P(a_w W + a_{N_2} X_{N_2} + a_{O_2} X_{O_2}) \quad (\text{A2.15})$$

Dans le cas d'un mélange gazeux à base d'hélium, avec une fraction molaire d'oxygène variable, on utilisera la relation :

$$P_e = P(a_w W + a_{He} X_{He} + a_{O_2} X_{O_2}) \quad (\text{A2.16})$$

avec a_{He} et X_{He} étant respectivement le coefficient de band-broadening et la fraction molaire de l'hélium. Il est important de rappeler que dans notre cas, tous les coefficients sont relatif à l'air (et non pas à l'azote).

AII.2.2.2 : Pression équivalente affectant la vapeur d'eau

Une correction pour le band-broadening par le CO₂ n'est pas nécessaire, étant donné sa très faible fraction molaire. Ainsi, l'équation permettant la détermination de la pression équivalente dans un mélange gazeux à base d'azote prend la forme :

$$P_e = P(a_{N_2} X_{N_2} + a_{O_2} X_{O_2}) \quad (\text{A2.17})$$

et dans un mélange à base d'hélium :

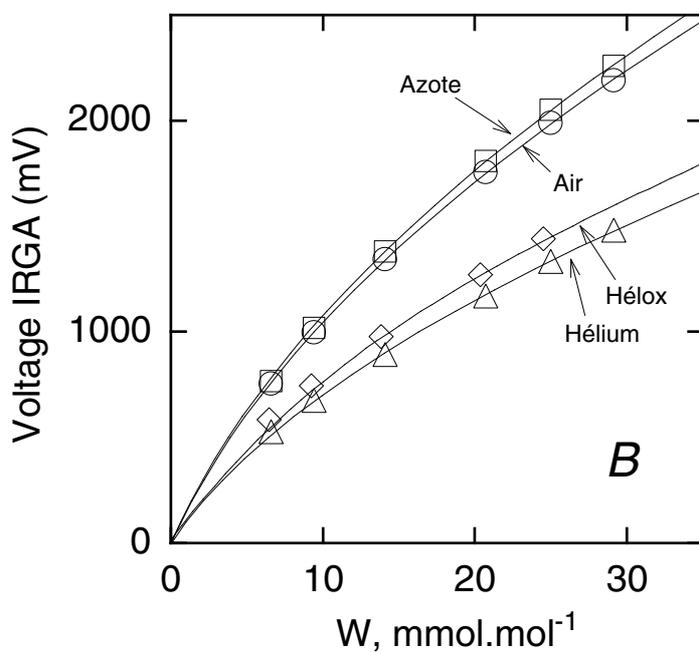
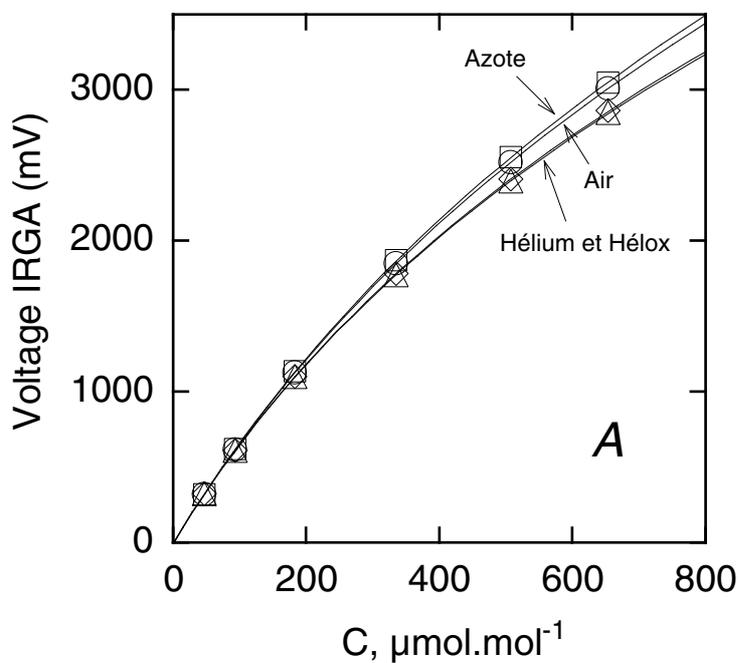
$$P_e = P(a_{He} X_{He} + a_{O_2} X_{O_2}) \quad (\text{A2.18})$$

Comme pour le CO₂, les coefficients affectant la vapeur d'eau sont relatif à l'air.

Tableau A2.1 : Coefficients de "band-broadening" des différents gaz composant le mélange gazeux, pour le CO₂ et la vapeur d'eau. L'air est pris comme référence (*ie* $a_{\text{air}} = 1$). Ces coefficients ont, à l'exception de celui pour la vapeur d'eau, été estimés expérimentalement au cours de cette thèse. Le coefficient de band broadening par la vapeur d'eau (en italique) est donné par Licor Inc (*cf.* notice technique du Li-6262).

Gaz considérés	Coefficients de Band-Broadening	
	pour le CO ₂	pour la vapeur d'eau
Azote	1.05	1.03
Oxygène	0.864	0.879
Hélium	0.843	0.673
Vapeur d'eau	<i>1.5</i>	-

Figure A2.1 : Détermination des coefficients de band-broadening pour le CO₂ et la vapeur d'eau. Le voltage de l'IRGA a été mesuré pour une gamme de concentration de CO₂ (fig. A), et de vapeur d'eau (fig. B) dans l'air (ronds), l'azote (carrés), l'hélium (triangles) et l'hélox (losanges). Les relations obtenues ont ensuite été ajustées pour déterminer les coefficients de band broadening.



AII.3 : Estimation des coefficients de band-broadening

Les coefficients de band-broadening ont été déterminés au cours de cette thèse en analysant expérimentalement la relation entre voltage des IRGA et concentrations en CO₂ et en vapeur d'eau. Le voltage a été mesuré pour une gamme de fraction molaire de CO₂ (figure A2.1A) et de vapeur d'eau (figure A2.1B) dans les mélanges gazeux utilisés, puis les relations obtenues ont été ajustées à l'aide des équations des analyseurs corrigées pour le band-broadening (équations A2.12 et A2.13 respectivement pour le CO₂ et la vapeur d'eau) pour déterminer les coefficients de band-broadening de l'azote, de l'oxygène et de l'hélium affectant le CO₂ et la vapeur d'eau. Les coefficients sont déterminés en prenant l'air comme référence. Le résultat de ces étalonnages s est présenté dans le tableau A2.1.

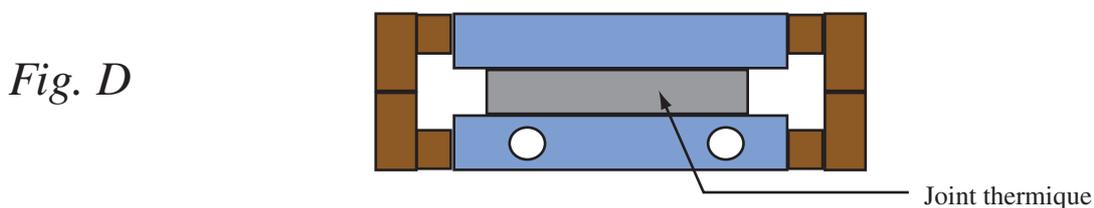
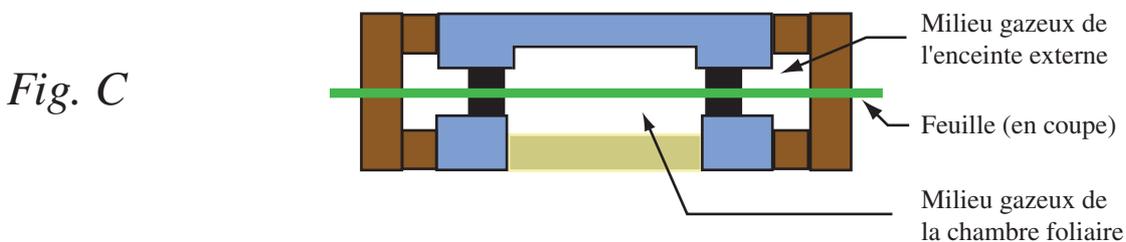
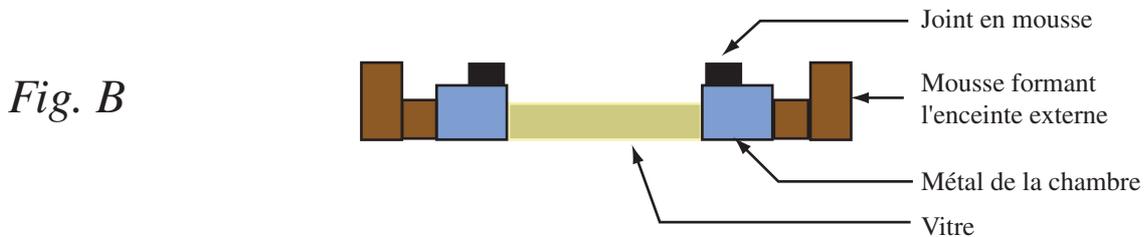
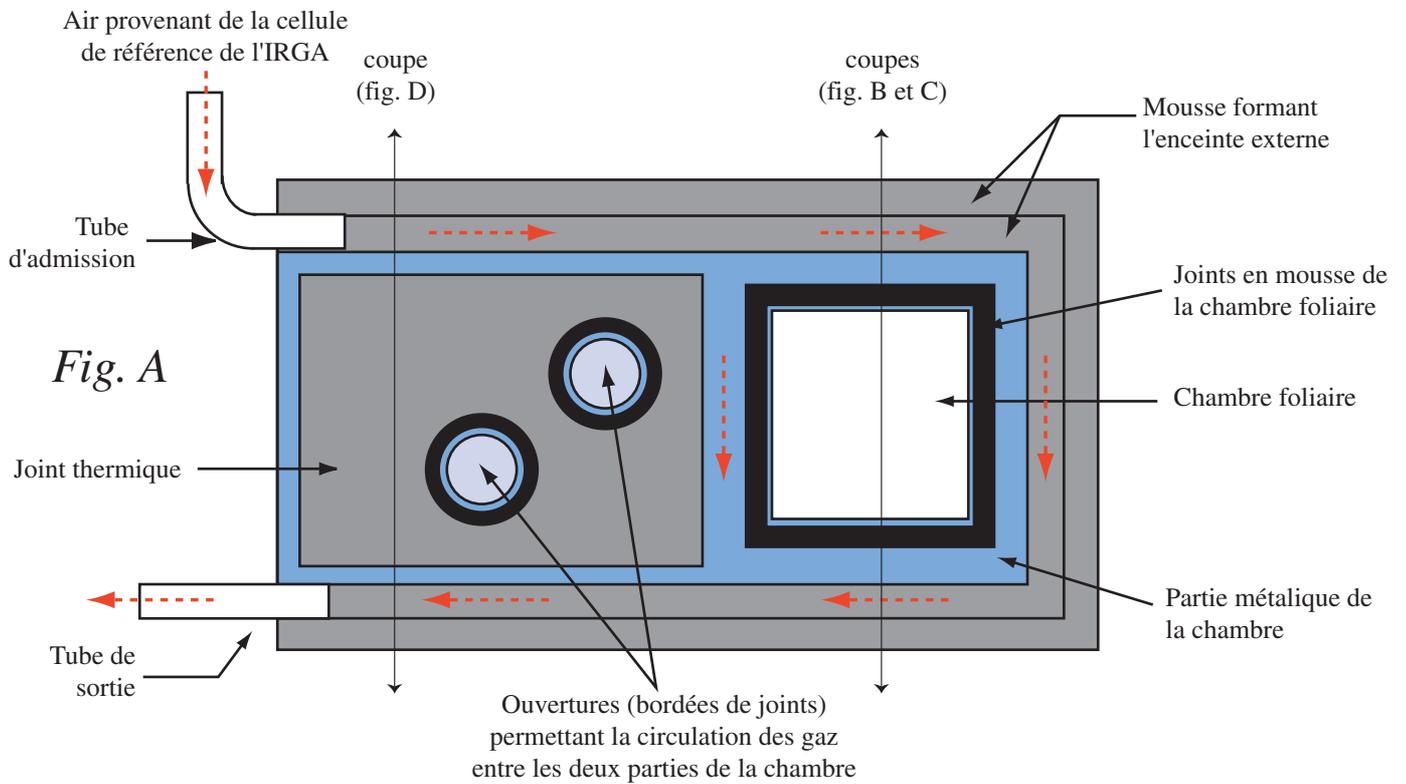
AII.4 : Etalonnage des IRGA avant une expérimentation

Un étalonnage unique de l'IRGA est nécessaire avant chaque expérimentation. Il est effectué avec de l'air sec ayant une fraction molaire de CO₂ connue, puis avec de l'air humidifié dont on connaît précisément la fraction molaire de vapeur d'eau (*cf.* annexe I). Il n'est pas nécessaire de réaliser un étalonnage dans les autres mélanges gazeux (azote, hélium et hélox), car la réponse de l'IRGA dans ces mélanges est prédite sur la base de l'étalonnage de l'IRGA dans l'air et des coefficients de band-broadening (déterminés avec l'air sec comme référence).

ANNEXE III

Modifications apportées à la chambre foliaire
pour minimiser la diffusion du CO₂

Figure A3.1 : Chambre d'échange gazeux conçue pour minimiser la diffusion du CO₂ par les joints.
 Le schéma A présente une vue de dessous de la partie supérieure de la chambre. L'enceinte formant la chambre foliaire est entourée d'une seconde enceinte, dans laquelle circule le gaz provenant de la cellule de référence de l'IRGA (les flèches en pointillé indiquent les directions de circulation du gaz). Le schéma B présente une coupe transversale au niveau de la chambre foliaire. Le schéma C présente une coupe transversale de la chambre en cours de mesure, avec les éléments supérieurs et inférieurs assemblés. Les milieux gazeux de l'enceinte externe et de la chambre foliaire ont une fraction molaire de CO₂ proche. Le schéma C présente une coupe transversale de la chambre au niveau du joint thermique.



AIII.1 : Introduction

Le milieu gazeux de la chambre foliaire est séparé de l'atmosphère ambiante par des joints en mousse de faible épaisseur (classiquement, 2 à 3 mm). Lorsque l'on travaille avec une faible fraction molaire de CO₂ dans la chambre, comme c'est le cas pour l'estimation de \square^* par la technique de Brooks et Farquhar, 1985 (*cf.* chapitre II), le gradient de fraction molaire entre la chambre et l'air ambiant devient très important (d'autant plus que lors d'un travail en laboratoire, la fraction molaire de CO₂ dans une pièce fermée est largement supérieure à celle de l'atmosphère). Ainsi, un phénomène de diffusion peut se produire par les joints, de l'air ambiant vers la chambre foliaire. Lorsque une grande précision dans la détermination de la fraction molaire de CO₂ dans la chambre est nécessaire, cette diffusion se révèle très problématique (données non présentées). Aussi, nous avons élaboré deux dispositifs originaux permettant de limiter la diffusion par les joints dans nos chambres d'échanges gazeux. Le principe de ces deux dispositifs consiste à réduire le gradient de fraction molaire de CO₂ entre la chambre foliaire, et le milieu gazeux environnant cette dernière.

AIII.2 : Modifications apportées à la chambre couplée au Licor 6262

Nous avons conçu et réalisé un dispositif créant une "enceinte externe" autour de la chambre foliaire. Le principe de ce dispositif consiste à faire en sorte que la fraction molaire de CO₂ dans l'enceinte soit proche de celle dans la chambre foliaire. Dans ce but, le gaz en sortie des cellules de référence et d'échantillon de l'IRGA est collecté, et dirigé vers l'enceinte externe de la chambre. Le gaz circulant dans l'enceinte autour de la chambre foliaire a ainsi une fraction molaire de CO₂ proche de celle dans la chambre. Le gradient de fraction molaire de CO₂ étant très faible, la diffusion du CO₂ par le joint de la chambre devient négligeable. Le principe de fonctionnement de ce dispositif est exposé dans la figure A3.1. L'enceinte externe est réalisée à l'aide de joints en mousse épais (entre 0.5 et 1cm), collés autour de la chambre. Il est important de s'assurer que le dispositif ne provoque pas de surpression dans le circuit d'échange gazeux.

Figure A3.2 : Présentation du Licor 6400 et de sa chambre foliaire. Cet instrument est composé d'une console (conditionnement des gaz), et d'une tête (comprenant la chambre foliaire et les IRGA). Le schéma B présente une vue de côté de la tête. La sortie des gaz placée sous la tête permet (à l'aide d'un connecteur spécial) de collecter les gaz provenant de l'IRGA. Source des illustrations : Licor, notice technique "Using the Li-6400".

Fig. A

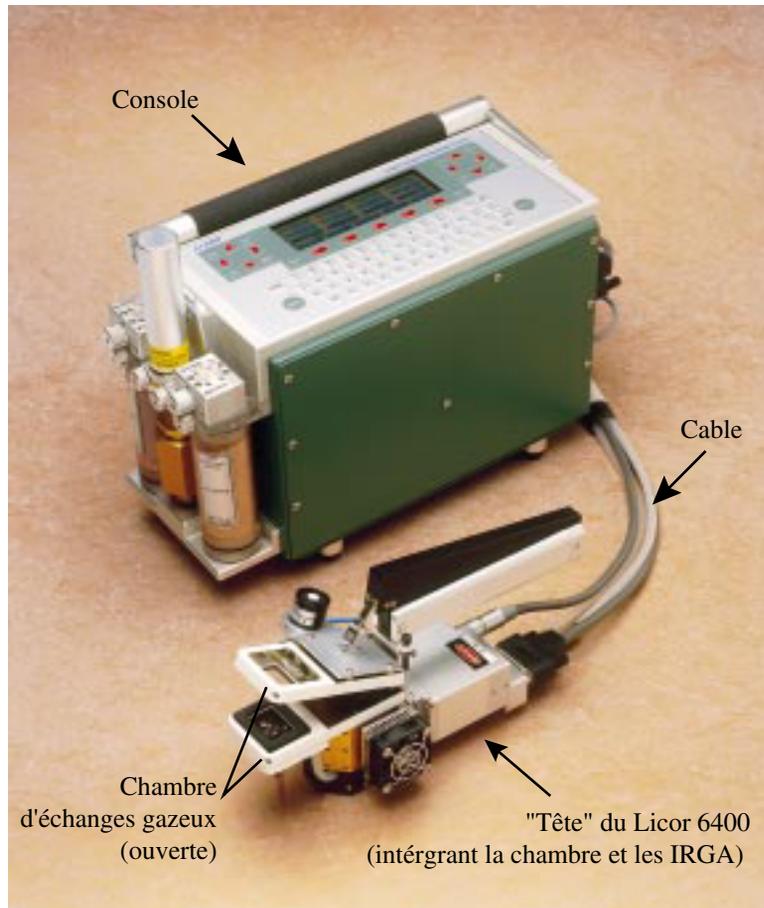
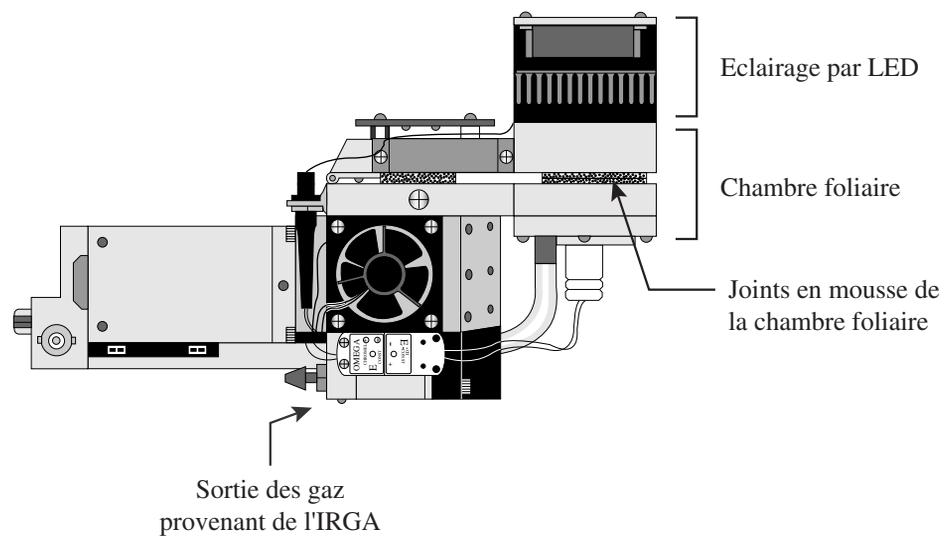


Fig. B



AIII.3 : Modifications apportées à la chambre du Licor 6400

Une partie de la tête du Licor 6400 (intégrant chambre d'échange gazeux et IRGA, *cf.* fig. A3.2) a été inséré dans un sac en polypropylène (fig. A3.3). Dans ce sac circule le gaz collecté en sortie de l'IRGA (au niveau de la valve de "match", à l'aide d'un connecteur spécial). Ainsi, l'atmosphère contenue dans le sac a une fraction molaire de CO₂ proche de celle dans la chambre foliaire, ce qui limite la diffusion par les joints. Lors d'une l'expérimentation, la feuille (détachée, et le pétiole maintenu dans un récipient d'eau), est placée à l'intérieur du sac, puis une portion est insérée (pincée) dans la chambre d'échanges gazeux. Le sac est ensuite fermé à l'aide de thermostat, et l'atmosphère contenue dans le sac est renouvelée par l'air en provenance de l'IRGA. Les principaux inconvénients de ce dispositif sont le temps de latence lié au renouvellement du gaz dans le sac (environ 2 à 5 minutes, selon le volume du sac), et l'obligation de travailler sur feuille détachée. A l'avenir, il est tout à fait envisageable d'adapter le système d'enceinte externe (*cf.* AIII.2) sur le Licor 6400.

ANNEXE IV

Détermination de la température foliaire
dans la chambre d'échanges gazeux par
thermométrie infrarouge

AIV.1 : Introduction

La fiabilité de l'estimation de la conductance stomatique repose en grande partie sur une estimation précise de T_f lors des échanges gazeux. T_f permet en effet de calculer une estimation de la fraction molaire de vapeur d'eau dans les espaces évaporants. La température requise pour l'estimation de la conductance stomatique est celle au niveau des sites évaporants du mésophylle (cavité sous stomatique), et la température de la surface foliaire est prise comme une estimation de cette dernière.

Trois principales approches existent pour estimer T_f : (i) une mesure par contact grâce à un thermocouple placé au contact de la feuille, (ii) une mesure à distance par thermométrie infra-rouge, (iii) et une estimation par le calcul du bilan d'énergie foliaire dans la chambre d'échanges gazeux. La technique utilisant un thermocouple est la plus fréquemment utilisée. Elle consiste en une jonction thermocouple de petite taille, placée contre la surface non illuminée de la feuille (en général abaxiale). Ce dispositif mesure une température supposée être proche de celle de la surface foliaire. Il est toutefois démontrable que la température ainsi mesurée est intermédiaire entre la température de surface et celle de l'air dans la chambre d'échanges gazeux (et tout particulièrement sous une atmosphère à base d'hélium). Par ailleurs, il s'agit d'une mesure ponctuelle, et la température estimée est erronée si le thermocouple se trouve placé contre une veine (zone faiblement transpirante), ou si l'épiderme se trouve percé pendant l'opération (élévation de la transpiration, donc diminution de la température). La méthode du bilan d'énergie foliaire est une technique souvent utilisée, et fournissant *a priori* une estimation de la température moyenne de la feuille. Toutefois, elle nécessite de décrire précisément l'environnement thermique de la feuille. Nous avons utilisé au cours de cette thèse une approche directement dérivée de cette technique pour estimer la conductance de couche limite foliaire à partir de la température foliaire (*cf.* annexe V).

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de développer une technique expérimentale basée sur l'utilisation d'un thermomètre infra-rouge (radiothermomètre). Les avantages de cette technique sont (i) l'absence de contact avec la feuille, et (ii) la possibilité d'intégrer la mesure de la température sur une grande surface foliaire (et non pas sur un point, comme avec un thermocouple). Elle offre également la possibilité d'estimer T_f en plusieurs points de la feuille. Ces principaux inconvénients sont la nécessité d'estimer préalablement l'émissivité foliaire, et de connaître la température ambiante. D'autre part, le coût d'un thermomètre infrarouge de qualité est élevé.

AIV.2 : Estimation de la température foliaire dans une chambre d'échanges gazeux par thermométrie infra-rouge

Estimation directe sur une feuille

Si l'on considère un objet d'émissivité ϵ_{objet} , dont on mesure la luminance spectrale dans la gamme de longueur d'onde λ_1 - λ_2 , on peut écrire (cf. références citées dans Guyot, 1997) :

$$L_{\text{lue}}^{\lambda_1\lambda_2} = \epsilon_{\text{objet}} \cdot L_{\text{objet}}^{\lambda_1\lambda_2} + (1 - \epsilon_{\text{objet}}) L_{\text{amb}}^{\lambda_1\lambda_2} \quad (\text{A4.1})$$

avec :

$L_{\text{lue}}^{\lambda_1\lambda_2}$: luminance spectrale estimée par le thermomètre infrarouge

$L_{\text{amb}}^{\lambda_1\lambda_2}$: luminance spectrale ambiante

$L_{\text{objet}}^{\lambda_1\lambda_2}$: luminance spectrale de l'objet dont on veut connaître la température

ϵ_{objet} : émissivité spectrale de l'objet

En intercalant une vitre en Séléniure de Zinc (ZnSe)

Dans notre montage expérimental, la mesure est effectuée au travers d'une vitre en séléniure de zinc (ZnSe). Connaissant les propriétés de cette vitre dans l'infrarouge thermique ($\tau_{\text{vitre}} = 0$ d'où $\tau + \epsilon = 1$), on peut poser l'équation suivante :

$$L_{\text{lue}}^{\lambda_1\lambda_2} = \tau_{\text{filtre}} \cdot \epsilon_{\text{objet}} \cdot L_{\text{objet}}^{\lambda_1\lambda_2} + \tau_{\text{filtre}} \cdot (1 - \epsilon_{\text{objet}}) \cdot (\tau_{\text{feuille}} \cdot L_{\text{amb}}^{\lambda_1\lambda_2}) + (1 - \tau_{\text{filtre}}) \cdot L_{\text{amb}}^{\lambda_1\lambda_2} \quad (\text{A4.2})$$

avec :

$L_{\text{filtre}}^{\lambda_1\lambda_2}$: luminance spectrale du filtre

τ_{filtre} : transmittance spectrale du filtre (0.95 pour la gamme λ_1 λ_2 8 à 14 μm)

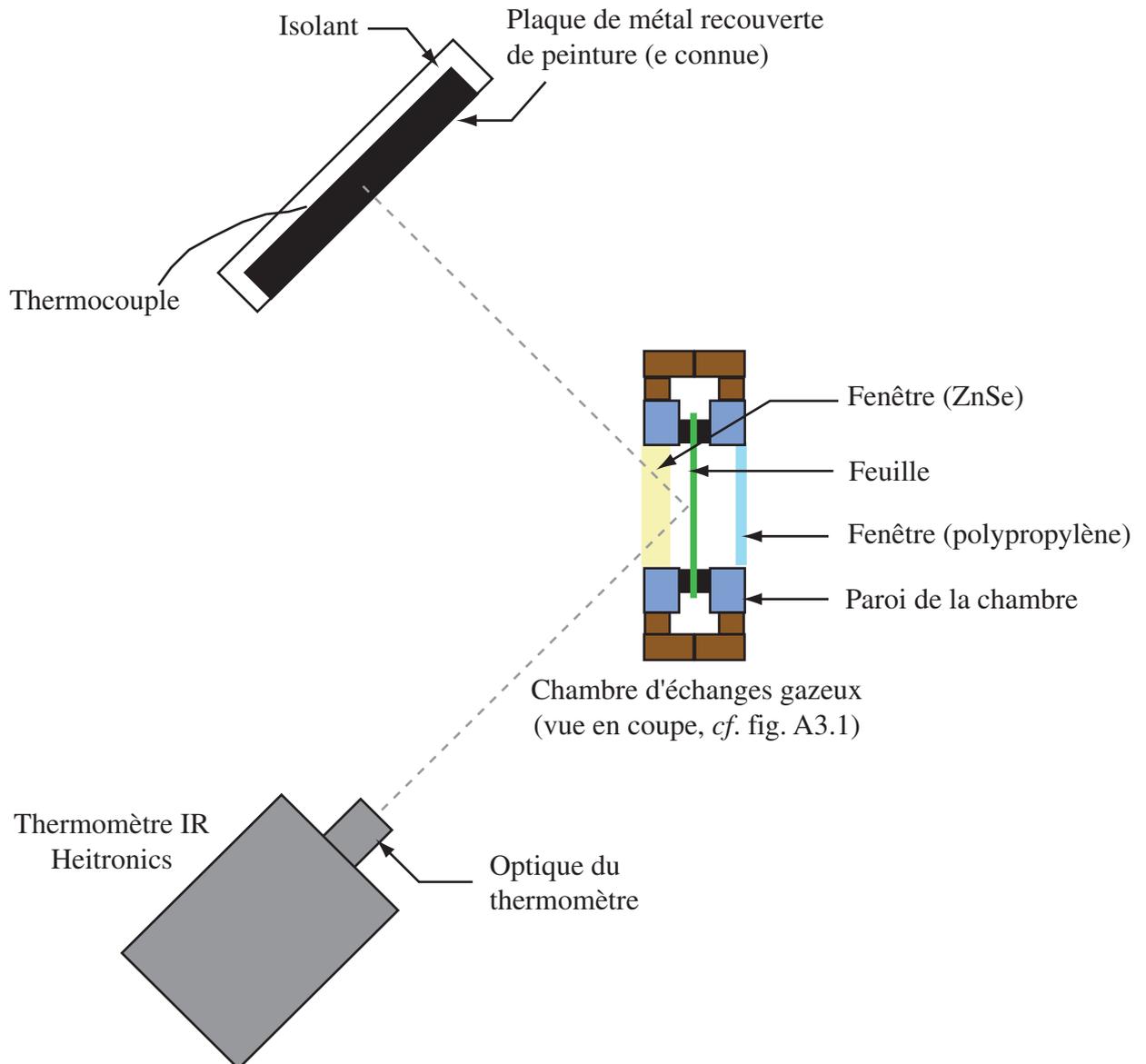
après réarrangement, on obtient :

$$L_{\text{objet}}^{\lambda_1\lambda_2} = \frac{1}{\tau_{\text{filtre}} \cdot \epsilon_{\text{objet}}} \left(L_{\text{lue}}^{\lambda_1\lambda_2} - \tau_{\text{filtre}} \cdot L_{\text{amb}}^{\lambda_1\lambda_2} \right) + \frac{1 - \tau_{\text{filtre}} (1 - \epsilon_{\text{objet}})}{\epsilon_{\text{objet}}} \quad (\text{A4.3})$$

et en faisant l'approximation (entre 0.1 et 0.3% près, avec $\tau_{\text{filtre}} = 0.95$ et ϵ_{objet} entre 0.95 et 0.98)

que le terme $\frac{1 - \tau_{\text{filtre}} (1 - \epsilon_{\text{objet}})}{\epsilon_{\text{objet}}} = 1$, on obtient :

Figure A4.1 : Montage expérimental permettant l'estimation de la température foliaire par thermométrie IR. La chambre foliaire est équipée de deux fenêtres : la première en polypropylène permet l'éclairement de la feuille ainsi que la mesure de fluorescence chlorophyllienne, et la seconde en séléniure de zinc (ZnSn), est utilisée pour la mesure IR. Le séléniure de zinc est un matériau ayant une transmittance très élevée dans l'IR thermique. Le thermomètre IR est placé obliquement par rapport à la vitre ZnSn, de manière à recevoir la réflexion de la plaque de métal peinte, et non la réflexion ambiante de la pièce où est réalisée la mesure.



$$L_{objet}^{\lambda_1 \lambda_2} = \frac{1}{\tau_{filtre} \cdot \tau_{objet}} \left(L_{lue}^{\lambda_1 \lambda_2} \cdot \tau_{objet} + L_{amb}^{\lambda_1 \lambda_2} \right) + L_{amb}^{\lambda_1 \lambda_2} \quad (A4.4)$$

En considérant que la température (T) est une fonction linéaire de la luminance spectrale dans la gamme 20-30°C, l'équation (A4.4) devient :

$$T_{objet} = \frac{1}{\tau_{filtre} \cdot \tau_{objet}} \left(T_{lue} \cdot \tau_{objet} + T_{amb} \right) + T_{amb} \quad (A4.5)$$

avec :

T_{objet} : température de l'objet (°C)

T_{lue} : température lue par le thermomètre infrarouge (°C)

T_{amb} : température ambiante (°C)

AIV.3 : Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est présenté dans la figure A4.1. Le thermomètre IR utilisé est un Heitronics KT1982, répondant dans la gamme spectrale 8-14 μ m. La vitre de la chambre est en sélénium de zinc traitée anti-reflet. Cette fenêtre possède une transmittance très élevée dans la gamme de longueurs d'ondes utilisée par le thermomètre IR ($\tau=0.95$). Le thermomètre est placé obliquement par rapport aux plans de la vitre et de la feuille, de manière à ce que les infrarouges thermiques réfléchis par la vitre et par la feuille soient ceux d'une plaque métallique utilisée comme un pseudo corps noir. Cette plaque métallique est recouverte d'une peinture d'émissivité élevée et connue ($\tau=0.95$), et sa température est estimée à l'aide d'un thermocouple. Ainsi, la température ambiante utilisée dans l'équation (A4.5) est celle de la plaque métallique.

AIV.4 : Etalonnage du thermomètre Heitronics sur un objet d'émissivité et de température connue placé dans la chambre

Le thermomètre infrarouge a été étalonné sur une plaque de métal peinte d'émissivité connue, placée dans la chambre d'échanges gazeux, et dont la température est estimée par un thermocouple. La relation entre T_{objet} et T_{lue} a été mesurée en faisant varier la température de l'objet dans la chambre, pour différentes températures ambiantes. La relation (A4.5) a été modifiée de manière à prendre en compte cet étalonnage. Ainsi, on obtient :

$$T_{objet} = \frac{1}{\tau_f \cdot \tau_{objet}} \left(T_{lue} \cdot \tau_{objet} + T_{amb} \right) + T_{amb} \cdot a + b \quad \text{avec } a=1 \text{ et } b=0.2 \quad (A4.6)$$

Après correction, l'écart entre la température mesurée par le thermocouple, et celle calculée à l'aide du thermomètre IR est de + ou - 0.1°C en moyenne, avec des écart maximum de + ou - 0.2°C.

AIV.5 : Détermination de l'émissivité de la feuille

L'émissivité des feuilles du peuplier "peace", du rosier, du laurier rose et du chêne vert ont été estimées en mesurant la température, grâce au thermomètre infra-rouge, de la face abaxiale de disques foliaires mis à flotter dans l'eau d'un bac thermostaté. Le réglage de l'émissivité du thermomètre est modifié, jusqu'à ce que l'estimation de la température foliaire soit égale à la température de l'eau du bac. Les émissivités ainsi mesurées sont de 0,98 pour le peuplier, le rosier et le chêne, et de 0.97 pour le laurier rose. Ces valeurs d'émissivité sont similaires avec celles publiées par Idso *et al.* (1969) chez un rosier et un peuplier (respectivement 0,99 et 0,98), pour la gamme de longueurs d'onde 7-16 μ m.

ANNEXE V

Estimation de la conductance de couche limite
par la méthode du bilan d'énergie foliaire

AV.1 : Introduction

Une estimation de la conductance de couche limite au CO₂ dans tous les mélanges gazeux utilisés pendant cette thèse est nécessaire pour estimer de manière fiable la conductance stomatique, et donc la fraction molaire de CO₂ aux sites évaporants du mésophylle. La méthode la plus communément employée pour déterminer la conductance de couche limite à la vapeur d'eau (g_w^b) est de placer une surface évaporante (*eg.* buvard humide), de surface connue, dans un système d'échanges gazeux. Dans le cas de cette surface, la seule limitation à l'évaporation est la couche limite, et la conductance estimée par le système d'échanges gazeux est g_w^b . Toutefois, des tests réalisés pendant ma thèse (données non présentées) ont permis d'identifier plusieurs problèmes posés par cette méthode. Des mesures de température réalisées par thermométrie infrarouge (données non présentées) ont révélé l'existence d'un gradient de température (et donc d'évaporation) significatif entre les bords du buvard et son centre. Ce gradient est augmenté lors de l'utilisation de mélanges gazeux à base d'hélium. D'autre part, la conductance de couche limite d'un buvard (surface plane) peut être différente de celle d'une feuille, laquelle présente généralement des particularités anatomiques modifiant l'écoulement de l'air à sa surface (pilosité, cryptes, *cf.* chapitre I). Etant donné ces problèmes, nous avons choisi de développer une approche reposant le bilan d'énergie foliaire d'une feuille placée dans une chambre d'échanges gazeux. Cette approche nous a permis d'estimer g_w^b pour chaque feuille, et pour chaque mélange gazeux (air, hélium et héliox).

AV.2 : Méthode du bilan d'énergie foliaire

Cette méthode, dérivée de celle décrite par Parkinson, 1985, utilise le bilan énergétique à l'équilibre thermique d'une feuille placée dans une chambre d'échange gazeux. A l'équilibre thermique, le bilan est nul, et peut s'écrire d'après la relation :

$$2 \rho_x C_{px} (T_a - T_f) g_{chaleur,x}^b + 2 \sigma (T_c^4 - T_f^4) + I \alpha E = 0 \quad (A5.1)$$

avec : T_f : température foliaire (Kelvins), T_a : température de l'air dans la chambre (K), T_c : température des parois de la chambre (K), E : transpiration (en $\mu\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), C_{px} : chaleur spécifique du gaz x, ρ_x : densité du gaz x (avec x = air, azote, hélium ou héliox), σ : constante de Stefan Boltzmann ($5.6696 \cdot 10^{-8} \text{ W} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$), I : éclairement incident (en $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), α : absorptance foliaire, corrigée par un facteur de conversion de l'énergie lumineuse (conversion des $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en W) spécifique à la bande passante du filtre bleu BG39 utilisé sur le montage d'imagerie de fluorescence, ϵ : émissivité de la feuille, L_v : chaleur latente de vaporisation de l'eau ($2454 \cdot 10^3 \text{ J} \cdot \text{K} \cdot \text{g}^{-1}$ à 25°C et à 1 atmosphère). $g_{chaleur,x}^b$ est la conductance de couche limite

aux transferts de chaleur dans le gaz x. Pour convertir cette conductance en conductance à la vapeur d'eau, on pose (Monteith, 1973) :

$$g_{chaleur,x}^b = g_{w,x}^b \cdot \frac{D_{chaleur,x}}{D_{w,x}} \quad (A5.2)$$

avec : $g_{w,x}^b$: conductance de couche limite à la vapeur d'eau dans le gaz x, $D_{chaleur,x}$ et $D_{w,x}$: respectivement les diffusivités de la chaleur et de la vapeur d'eau dans le gaz x. La relation (A5.1) peut ainsi être réécrite :

$$2 \frac{\rho_x}{\rho_a} C_{px} (T_a - T_f) \frac{D_{chaleur,x}}{D_{w,x}} g_{w,x}^b + 2 \frac{\rho_x}{\rho_a} (T_c^4 - T_f^4) + \rho_x \Delta E = 0 \quad (A5.3)$$

Pour simplifier cette expression, on considère que la température des parois de la chambre est très proche de celle de l'air de la chambre : soit $T_c \approx T_f$. Cette approximation suppose que la température de l'air est mieux couplée à celle de la chambre qu'à celle de la feuille, ce qui a été vérifié dans notre chambre d'échanges gazeux. La différence entre T_a et T_f étant faible, on pose également comme approximation :

$$T_c^4 - T_f^4 \approx 4 T_a^3 (T_a - T_f) \quad (A5.4)$$

Ce qui nous permet de reformuler l'équation (A5.3) d'après la relation :

$$2 \frac{\rho_x}{\rho_a} C_{px} (T_a - T_f) \frac{D_{chaleur,x}}{D_{w,x}} g_{w,x}^b + 2 \left[4 \frac{\rho_x}{\rho_a} T_a^3 (T_a - T_f) \right] + \rho_x \Delta E = 0 \quad (A5.5)$$

Ainsi, $g_{w,x}^b$ peut être estimée pour chaque feuille et chaque mélange gazeux selon la relation :

$$g_{w,x}^b = \frac{\rho_x \Delta E}{2 C_{px} (T_a - T_f) \frac{D_{chaleur,x}}{D_{w,x}}} \quad (A5.6)$$

Résumé : L'activité photosynthétique foliaire est fonction de la disponibilité en CO₂ au niveau de la Rubisco dans le chloroplaste. La disponibilité en CO₂ est déterminée par une série de limitations au transfert du CO₂ entre l'air ambiant et les sites enzymatiques de la Rubisco, qui sont à l'origine d'un gradient de concentration. La limitation à la diffusion du CO₂ dans le mésophylle, d'abord dans le réseau des espaces gazeux intercellulaires puis dans la cellule, contribue de manière très significative à ce gradient. Cette limitation est quantifiée sous la forme d'une conductance au transfert du CO₂ : la conductance interne (g^i). Ce travail de thèse a été consacré à l'étude de la diffusion du CO₂ dans le mésophylle des plantes ayant un métabolisme photosynthétique de type C3. Nous avons tout d'abord amélioré l'estimation de g^i grâce à une méthode d'analyse simultanée des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne. Nous avons ensuite analysé les deux composantes déterminant g^i : la limitation dans les espaces gazeux intercellulaires du mésophylle, et la limitation en phase liquide cellulaire. Nous montrons, grâce à une approche originale d'estimation de g^i dans une atmosphère à base d'hélium, chez le peuplier, le rosier, le chêne vert et le laurier rose, que la totalité de g^i est déterminée par la limitation en phase liquide cellulaire. Enfin, nous avons étudié la variabilité interspécifique et phénotypique de g^i . Nous confirmons l'existence d'une corrélation entre g^i et l'assimilation maximale pour les différentes espèces étudiées (espèces citées ci-dessus, et chez le noyer et le lamier), et nous montrons que la présumée distinction entre ligneux présentant une faible g^i et herbacées présentant une forte g^i n'est pas pertinente. Nous montrons également que chez le noyer, une réponse de g^i accompagne l'acclimatation foliaire à l'environnement lumineux, et proposons une paramétrisation de g^i pour modéliser la photosynthèse.

Mots clefs : photosynthèse foliaire, transfert du CO₂, conductance interne, mésophylle, rubisco, respiration, acclimatation à la lumière, échanges gazeux

Abstract : Leaf photosynthetic activity depends on the CO₂ availability at Rubisco. This availability arises from a series of limitations to CO₂ transfer between ambient air and carboxylation sites in the chloroplasts, resulting in a mole fraction gradient. A large part of this gradient is the consequence of a limitation to CO₂ transfer within the mesophyll, starting in the intercellular gaseous phase, and ending in the cellular liquid phase. This limitation within mesophyll is quantified as a conductance to CO₂ transfer *i.e.* the internal conductance (g^i). The aim of this work was to study CO₂ diffusion within the mesophyll for plants with a C3 metabolism. First, we improve the g^i estimation using a method combining measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence. We subsequently analyse the two components determining g^i : the limitation to CO₂ transfer in the intercellular air spaces network, and the limitation in the liquid phase within cells. Using an original approach for g^i estimation in an helium based atmosphere, we show that the main component of g^i is the limitation to CO₂ transfer in the cellular liquid phase. Finally, we studied the interspecific and phenotypic variability of g^i . Our results confirm the existence of an interspecific positive correlation between g^i and maximum net assimilation, and show that the putative discrepancy between typically low g^i in ligneous species and typically high g^i in herbaceous species is not valid. We also show that leaf acclimation to irradiance in walnut go together with g^i variations, and we propose a way to scale g^i into photosynthetic models.

Keywords : Leaf photosynthesis, CO₂ transfer, internal conductance, mesophyll, rubisco, respiration, light acclimation, gas exchange