



**HAL**  
open science

# Téledétection optique des réponses des forêts aux stress abiotiques

Elodie Merlier

► **To cite this version:**

Elodie Merlier. Téledétection optique des réponses des forêts aux stress abiotiques. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS022 . tel-01298702

**HAL Id: tel-01298702**

**<https://theses.hal.science/tel-01298702>**

Submitted on 6 Apr 2016

**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.

NNT2016SACLS022

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567  
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Biologie

Par

**Elodie MERLIER**

Téledétection optique des réponses des forêts aux stress abiotiques

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 29 janvier 2016 :  
Composition du Jury :**

Mme, DAMESIN, Claire	Pr <i>ESE-Université Paris-Saclay</i>	Présidente
Mr, OLIOSO, Albert	DR <i>INRA Avignon</i>	Rapporteur
Mr, PROISY, Christophe	CR HDR <i>IRD Montpellier</i>	Rapporteur
Mr, BAGARD, Matthieu	MdC <i>IEES-Université Paris-Est Créteil</i>	Examineur
Mr, GOULAS, Yves	IR HDR <i>Ecole Polytechnique</i>	Examineur
Mme, KRIEGER- LISZKAY, Anja	DR <i>CEA- Université Paris-Saclay</i>	Examinatrice
Mme, MAIGNAN, Fabienne	DR <i>CEA-Université Paris-Saclay</i>	Invité
Mr, SOUDANI, Kamel	MdC <i>ESE-Université Paris-Saclay</i>	Directeur de thèse



**Titre :** Télédétection optique des réponses des forêts aux stress abiotiques

**Mots clés :** télédétection, photochemical reflectance index, écophysiologie, contrainte abiotique, photosynthèse

**Résumé :**

Anticiper les impacts des changements climatiques sur les écosystèmes terrestres, notamment sur le cycle du carbone, nécessite la compréhension et la quantification du fonctionnement photosynthétique des végétaux et leurs réponses aux contraintes abiotiques. Suivre l'évolution des propriétés spectrales des couverts végétaux par la télédétection permet d'avoir accès à leur fonctionnement à des échelles spatiales et temporelles variées. Plusieurs indicateurs optiques ont été développés afin d'accéder à la structure, la biochimie et le fonctionnement écophysiologique des végétaux. Le PRI (photochemical reflectance index), déterminé à partir de la réflectance mesurée dans des bandes étroites à 531 nm et 570 nm, est un proxy de l'efficacité de la plante à utiliser la lumière (LUE, light use efficiency) et plus particulièrement du cycle des xanthophylles, utilisé par la plante pour dissiper l'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. Cependant son usage à l'échelle du couvert végétal, ou à plus larges échelles temporelles et spatiales, entraîne l'implication de nombreuses sources de variabilités qui masquent la sensibilité du PRI au fonctionnement photosynthétique, particulièrement les variations biochimiques et phénologiques. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les facteurs qui jouent sur la variabilité du PRI à l'échelle de la feuille et du couvert, afin de caractériser ses réponses aux variations abiotiques de l'environnement et de démêler la composante phénologique de la composante physiologique du PRI. Des études ont été menées en conditions contrôlées, semi-naturelles et naturelles, sur des jeunes arbres et en forêt adulte, soumis à différentes contraintes abiotiques. L'analyse des courbes de réponse du

PRI aux variations de lumière incidente utilisée pour la photosynthèse (PAR, photosynthetically active radiation) permet d'isoler 3 paramètres. Le  $PAR_{sat}$ , la valeur de PAR pour laquelle le PRI sature, le  $PRI_0$ , la valeur du PRI à une intensité lumineuse faible (mesurée) ou nulle (estimée) et le  $\Delta PRI$ , l'amplitude de variation entre le  $PRI_0$  et la valeur de PRI maximum. En période de végétation, la variabilité du  $PAR_{sat}$  est principalement contrôlée par la disponibilité en eau pour la plante. La variabilité du  $PAR_{sat}$  est aussi impactée par la concentration d'ozone atmosphérique. En période de débourrement et de sénescence, la variabilité du contenu en chlorophylle régit la valeur du  $PAR_{sat}$ . Ce paramètre explique la variabilité physiologique du PRI et varie en fonction du facteur limitant la photosynthèse. La variabilité du  $PRI_0$  a été expliquée par la variabilité du contenu biochimique des feuilles en réponse au cycle saisonnier de la chlorophylle et à sa variabilité en conditions de stress. A l'échelle de la canopée, la variabilité de la structure du couvert s'ajoute à la variabilité biochimique du  $PRI_0$ . Le  $PRI_0$ , en temps que composante phénologique de la variabilité du PRI, peut être utilisé pour corriger le PRI afin de lui soustraire la variabilité structurale et obtenir un  $PRI_c$  fortement corrélé à la LUE. A l'échelle de la canopée, il a été montré que le PRI est principalement représentatif de la strate supérieure du couvert. Le  $\Delta PRI$  n'a montré aucune variation intra et inter-journalière, suggérant que le PRI répond non pas au contenu en xanthophylle des plantes, mais à un ratio maintenu constant. Ces résultats mettent en évidence l'importance d'isoler les différentes sources de variabilité du PRI avant de l'utiliser comme proxy du fonctionnement photosynthétique des écosystèmes terrestres.

**Title :** Optical responses of forest canopies to abiotic stress

**Keywords :** remote sensing, photochemical reflectance index, ecophysiology, abiotic constraint, photosynthesis

**Abstract :**

Anticipating impacts of climate change on terrestrial ecosystems, particularly on the carbon cycle, requires the understanding and the quantification of the plant photosynthetic functioning and of their responses to abiotic factors. Tracking variations of spectral properties of plants using remote sensing allows the access of plant functioning at various spatial and temporal scales. Several optical indices have been developed to assess plant canopy structure, biochemistry and ecophysiological functioning. The PRI (photochemical reflectance index), determined from reflectances measured in narrow bands at 531 nm and 570 nm, may be used as a proxy of light use efficiency (LUE) at leaf and canopy scales, and more particularly of the xanthophyll cycle used by plants to dissipate the excess light energy as heat. However the use of PRI at the canopy scale and at large temporal and spatial scales faces several difficulties related to the involvement of different sources of variability that blur PRI sensitivity to photosynthetic functioning. These sources of PRI variability are particularly linked to spatial and temporal variations of biochemical and phenological canopy properties. The aim of these studies is to better understand the factors affecting PRI variability at leaf and canopy scales, to assess the strength of the relationships between PRI and vegetation responses to environmental abiotic constraints and disentangling the phenological component from the physiological component of PRI. Studies were conducted under controlled, semi-natural and natural conditions, on young trees and a mature deciduous forest subjected to various abiotic constraints. The analysis of PRI responses to the variations of

photosynthetically active radiation (PAR) allowed isolating three parameters. The  $PAR_{sat}$ , the PAR value at the PRI saturation; the  $PRI_0$ , the value of PRI at dim light (measured) or in darkness (estimated) and the  $\Delta PRI$ , the range of PRI variations between the  $PRI_0$  and the maximum value of PRI. During the leaf growing season,  $PAR_{sat}$  variability is mainly controlled by the availability of water content for the plant. The  $PAR_{sat}$  variability is also impacted by the atmospheric ozone concentration. During the phenological phases of budburst and the senescence, the variability of the leaf chlorophyll content governs  $PAR_{sat}$  values. This parameter describes the physiological variability of PRI and varies depending on the limiting factor for photosynthesis. The  $PRI_0$  variability has been explained by the dynamic of the biochemical content of the leaves linked to the seasonal variations of chlorophyll content and to abiotic stress conditions. At canopy scale, the structural variability is added to the biochemical variability of  $PRI_0$ . The  $PRI_0$ , as the phenological component of PRI variability, can be used to correct PRI, removing its structural variability to obtain a  $PRI_c$  strongly correlated to LUE. At canopy scale, it was shown that the PRI is mostly representative of the upper layer of the canopy. The  $\Delta PRI$  showed no variation within and between days, suggesting that the PRI does not respond to the plant xanthophyll content but rather to a ratio maintained constant. These results highlight the importance of isolating the different sources of PRI variability before its use as a proxy of the photosynthetic functioning of terrestrial ecosystems.





Thèse de doctorat préparée au  
Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution  
UMR 8079,  
Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech  
Faculté des Sciences d'Orsay

Directeur de thèse : Kamel SOUDANI, Maître de Conférence

ESE – Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay

## Remerciements

*En hommage à Lola Salines.*

Ce manuscrit est l'aboutissement de 3 ans de travail au sein de l'équipe Ecophysiologie Végétale du laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution et je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son bon déroulement. Cette thèse a été financée grâce à une allocation de recherche du programme R2DS Ile de France. Que toutes les personnes impliquées dans ce programme trouvent ici mes sincères remerciements, notamment le personnel administratif de l'ESE qui a géré ce projet, en particulier Sandrine Dessaints et Nathalie Lecat.

Je tiens à remercier en premier lieu mon encadrant, Kamel Soudani, qui m'a permis d'effectuer ce travail dans des conditions optimales. Merci de m'avoir transmis ton engouement pour le travail de recherche, merci d'avoir été présent, patient et conciliant. Merci pour ta bonne humeur et tes conseils. Tu es une source d'inspiration, c'est un réel plaisir de pouvoir travailler à tes côtés et je mesure la chance que j'ai de t'avoir eu comme directeur.

Je remercie énormément Gabriel Hmimina d'avoir été présent. Ton aide, tes avis, tes connaissances, ton expertise et ton amitié à toutes épreuves m'ont permis d'en arriver là. Depuis de nombreuses années tu m'enrichis, me guides et me conseilles et je ne t'en remercierai jamais assez.

Je remercie aussi les (nombreux) membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail ainsi que l'école doctorale Science du Végétal et plus particulièrement Jacqui Shykoff.

Un grand merci à l'équipe EV. Plus qu'une équipe, une grande famille qui permet à tous d'évoluer dans une atmosphère sereine, joyeuse et conviviale. Merci particulièrement à Zoran Cerovic et Gwendal Lattouche pour votre disponibilité et votre aide pour le dosage de pigments (entre autres!), ainsi que Eric Dufrêne, Nicolas Delpierre et Daniel Berveiller pour les sorties terrain, le traitement de données, les conseils de manips' et tout simplement nos échanges. Merci à Michelle Viel pour les nombreux broyages, ainsi qu'à Gabriel Cornic et Peter Streb pour l'aide apportée sur les mesures physiologiques. Merci à Lydie Blottière pour les échanges, les points de vue, les bières et l'apport de couleurs au quotidien. Merci aussi à mes acolytes présents et passés, Alice Delaporte, Guillaume Marie, Elena Granda, Marc Stephanon, Marine Pasturel et Nicolas Martin. Merci à mon ancien coloc' de bureau Joannès Guillemot (on se doit une crémaillère!) et mon actuel, Thomas Verbeke, de me supporter au quotidien. Merci à l'équipe de la plateforme du CEREEP Ecotron pour m'avoir bien accueilli, assisté et aidé lors de mes expériences.

Je remercie aussi mon équipe de roller derby La Boucherie de Paris, qui m'a permis de souffler et de m'essouffler pendant ces trois années. Une mention particulière pour Sokonnthéa Dam, Julia Hosteing, Marjorie Dumontel et la troupe de "vilaines". Sans oublier quelques (ex) nancéiens MP3F, Sophie Legrand, Mickael Thénot, Claire Berthelon, Paul Eberle, Matthieu Wagner et Laurent Weil. Merci aussi à Lucille Trevisan et Vivianne Tchichelle, nos échanges de mails étaient source de décompression! Un grand merci à Yoann Casals qui m'a supporté quotidiennement ces dernières années, et surtout ces derniers mois, en faisant preuve de patience et de zénitude.

Et enfin et surtout, merci à ma famille qui m'aide, me soutient et m'encourage depuis toujours.

# Table des matières

<b>Abréviations</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE I</b>	<b>14</b>
<b>Le suivi du fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux</b>	<b>14</b>
<b>1. Fonctionnement carboné et hydrique des forêts : Principaux mécanismes et méthodes d'analyse de leur fonctionnement</b>	<b>16</b>
1.1. Le cycle du carbone et le fonctionnement carboné et hydrique des forêts	16
1.2. L'utilisation et la régulation de la lumière absorbée par les plantes	19
1.2.1. La photosynthèse	20
1.2.2. La fluorescence	25
1.2.3. La dissipation thermique	28
<b>2. Les méthodes d'analyse du fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux en conditions naturelles</b>	<b>32</b>
2.1. L'analyse des échanges gazeux entre atmosphère et écosystème	32
2.2. L'emploi de la modélisation pour le suivi du fonctionnement des écosystèmes	33
2.3. La télédétection comme proxy du fonctionnement des couverts végétaux	34
2.4. Un indice spectral prometteur : le PRI	37
<b>3. Approches et méthodes mises en œuvre</b>	<b>48</b>
3.1. A l'échelle du couvert en conditions semi-contrôlées	48
3.2. A l'échelle de la feuille en conditions contrôlées	52
3.3. A l'échelle d'un couvert forestier mature en conditions naturelles	57
<b>4. Echantillonnages foliaires et dosages biochimiques réalisés</b>	<b>59</b>
4.1. Dosage de la chlorophylle	60
4.2. Dosage des anthocyanes	60
4.3. Dosage des xanthophylles	60
<b>CHAPITRE II</b>	<b>62</b>
<b>Explaining the variability of the photochemical reflectance index (PRI) at the canopy-scale: disentangling the effects of phenological and physiological changes</b>	<b>62</b>
<b>1. Abstract</b>	<b>65</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>66</b>
<b>3. Materials and methods</b>	<b>69</b>
3.1. Plant materials	69
3.2. Measurements	70
3.2.1. Canopy scale measurements	70
3.2.2. Leaf pigment measurements	72
3.3. Data analysis	73
<b>4. Results</b>	<b>76</b>
4.1. Temporal variability of canopy structure and physiology	76



4.2. Temporal variability of PRI at daily and seasonal scales _____	82
4.3. Distinguishing between the structural and the physiological variability of the PRI _____	85
<b>5. Discussion _____</b>	<b>89</b>
<b>6. Conclusions _____</b>	<b>93</b>
<b>CHAPITRE III _____</b>	<b>96</b>
<b>Potential use of the PRI and active fluorescence to diagnosis the physiological state of plants under drought and ozone stress _____</b>	<b>96</b>
<b>1. Abstract _____</b>	<b>99</b>
<b>2. Introduction _____</b>	<b>100</b>
<b>3. Materials and methods _____</b>	<b>103</b>
3.1. Experimental design, conditions and plant material. _____	103
3.2. Chlorophyll quantification _____	106
3.3. Data analysis _____	106
<b>4. Results _____</b>	<b>109</b>
<b>5. Discussion _____</b>	<b>116</b>
<b>6. Conclusions _____</b>	<b>121</b>
<b>CHAPITRE IV _____</b>	<b>122</b>
<b>PRI responses to climatic drought conditions in a mature deciduous forest _____</b>	<b>122</b>
<b>1. Abstract _____</b>	<b>124</b>
<b>2. Introduction _____</b>	<b>125</b>
<b>3. Material and methods _____</b>	<b>128</b>
<b>4. Results _____</b>	<b>132</b>
<b>5. Discussion _____</b>	<b>139</b>
<b>6. Conclusion _____</b>	<b>141</b>
<b>CHAPITRE V _____</b>	<b>144</b>
<b>Discussion Générale et conclusion _____</b>	<b>144</b>
<b>1. La réponse du PRI au PAR peut être décrite par trois paramètres _____</b>	<b>147</b>
1.1. La variabilité phénologique du PRI : le $PRI_0$ _____	147
1.2. L'intervalle de variabilité du PRI : le $\Delta PRI$ _____	149
1.3. La variabilité physiologique : le $PAR_{sat}$ _____	150
<b>2. Le PRI en tant que proxy du fonctionnement photosynthétique est sujet à des facteurs de variabilité liés aux contraintes abiotiques _____</b>	<b>152</b>
2.1. L'usage d'indices optiques pour suivre les impacts des facteurs abiotiques sur la photosynthèse _____	152
2.2. Effets des variations de lumière incidente _____	153

<b>3. Le PRI en tant que signal optique composite est sujet à des facteurs de variabilité spatiale et temporelle</b>	<b>155</b>
<b>4. Conclusions</b>	<b>156</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>160</b>
<b>Annexe 1</b>	<b>162</b>
<b>Quantification of xanthophylls content in woody species by UPLC-TOF analysis</b>	<b>162</b>
<b>1. Protocol</b>	<b>163</b>
1.1. Xanthophyll extraction	164
1.2. Liquid chromatography and UV detection	164
<b>Annexe 2</b>	<b>166</b>
<b>Deconvolution of pigment and physiologically-related PRI variability at the canopy scale over an entire growing season</b>	<b>166</b>
<b>1. Abstract</b>	<b>167</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>168</b>
<b>3. Materials and methods</b>	<b>170</b>
3.1. Plant materials and experimental setup	170
3.2. Measurements	171
3.2.1. Canopy-scale measurements	171
3.2.2. Leaf-scale measurements	173
3.2.3. Data analysis	173
<b>4. Results</b>	<b>175</b>
4.1. Seasonal variability of the soil water content, canopy structure, pigmentation and light use efficiency	175
4.2. Canopy physiological and optical responses to PPFD variations	178
4.3. Analysis of the PRI versus PPFD relationship	180
4.4. Deconvolution of the PRI variability	183
<b>5. Discussion</b>	<b>186</b>
<b>6. Conclusions</b>	<b>189</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>192</b>
<b>Liste des Tables</b>	<b>199</b>
<b>Références</b>	<b>200</b>

## Abréviations

aPAR	absorbed photosynthetically active radiation
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
DART	discrete anisotropic radiative transfer
EVI	enhanced vegetation index
F0	fluorescence à l'obscurité
Fm	fluorescence maximale pour une feuille adaptée à l'obscurité
Fm'	fluorescence maximale pour une feuille adapté à la lumière
Fs	fluorescence stationnaire
faPAR	fraction de PAR absorbé
GPP	gross primary production
LAI	leaf area index
LHCII	Light Haversting Complexe II
LMA	leaf mass area
LUE	light use efficiency
mNDI <sub>705</sub>	modified normalized difference index
NDVI	normalized difference vegetation index
NPQ	non photochemical quenching
PAR	photosynthetically active radiation
PAR <sub>sat</sub>	Valeur du PAR pour laquelle le PRI sature
PRI	photochemical reflectance index
PRI <sub>0</sub>	PRI d'une feuille adaptée à l'obscurité
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
qP	quenching photochimique
ROS	reactive oxygene species
RubisCO	ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase
SIF	solar induced fluorescence
TOF	time-of-flight
UPLC	ultra-performance liquid chromatography
VPD	vapour pressure deficit

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres.

Le premier chapitre constitue un état de l'art permettant de comprendre les tenants et aboutissants du recours à la télédétection et plus particulièrement à l'indice spectral PRI (photochemical reflectance index) en tant qu'indicateur de l'état du fonctionnement de la feuille et du couvert. Il fait état de l'importance du suivi du fonctionnement écophysologique des écosystèmes forestiers et évalue les potentialités offertes par la télédétection pour réaliser cet objectif. Un état actuel de la recherche est réalisé concernant le recours à la télédétection dans un but de détermination des changements de propriétés optiques des feuilles et des couverts végétaux. Ces réponses optiques aux changements environnementaux, si elles sont détectées précocement, peuvent permettre d'anticiper, voire de limiter, les dommages perçus par les plantes.

Le second chapitre est basé sur une approche expérimentale qui a permis d'acquérir des mesures optiques en continu et à très haute résolution temporelle (quelques minutes) au-dessus de trois mini-couverts de hêtre commun, de chêne pédonculé et de pin sylvestre. Les mesures ont été réalisées tout au long du cycle phénologique, depuis le débourrement jusqu'à la sénescence foliaire. Cette expérience a permis d'examiner la variabilité annuelle et intra-journalière du PRI mesurée à l'échelle de jeunes canopées en conditions semi-contrôlées de stress hydrique. Les mesures optiques à haute résolution temporelle ont été reliées aux paramètres biochimiques et physiologiques des couverts. Ce chapitre a permis d'utiliser et de valider une méthode de déconvolution du signal et d'isoler les sources de variabilité du PRI, en lien avec le stress appliqué. Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans « Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology » sous :

*Merlier E., Hmimina G., Dufrêne E., Soudani K. 2015. Explaining the variability of the photochemical reflectance index (PRI) at the canopy-scale: Disentangling the effects of*

*phenological and physiological changes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Volume 151, October 2015, Pages 161-171. DOI : 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.006*

Le troisième chapitre exploite des données expérimentales spectrales, biochimiques et physiologiques, acquises à l'échelle de la feuille en conditions contrôlées et répond à des questions soulevées dans le chapitre précédent. Deux types de stress ont été appliqués sur des jeunes plants de chêne vert et de chêne pédonculé. Les effets du stress hydrique induit par un déficit en eau de l'atmosphère et du stress oxydatif induit par l'ozone ont été étudiés individuellement et de manière successive. Cette expérience a permis d'examiner la variabilité du PRI en réponse à des variations abiotiques de l'environnement sous différentes conditions d'éclairement. Les mesures optiques ont été reliées aux paramètres biochimiques et physiologiques des feuilles. Ce chapitre a permis d'approfondir la compréhension des sources de variabilités du PRI en lien avec le stress appliqué et de relier ses paramètres avec des mesures de fluorescence chlorophyllienne. Un premier article issu de cette étude expérimentale est soumis dans « Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology » sous :

*Merlier E., Hmimina G., Bagard M., Dufrière E., Soudani K. Submitted. Potential use of the PRI and active fluorescence to diagnosis the physiological state of plants under drought and ozone stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*

Le quatrième chapitre est basé sur une approche de télédétection in situ en forêt adulte de Barbeau-Fontainebleau constituée de chênes pédonculé et sessile dans l'étage dominant et de charme commun en sous-étage. Le suivi et l'analyse des mesures optiques et physiologiques obtenues à partir de la tour à flux du site ont été réalisés lors de la saison de végétation de l'été 2015, en conditions de sécheresse estivale. Cette expérience a permis d'analyser la variabilité journalière du PRI en conditions naturelles afin d'identifier les principaux facteurs qui l'influencent. Ce chapitre a permis d'étudier l'impact d'une sécheresse sur la relation entre PRI et LUE et de confirmer l'utilisation de l'approche de déconvolution des différents

sources de variabilité du PRI établie à partir de mesures optiques sur des mini-couverts (chapitre II) sur un peuplement forestier adulte. Ce chapitre est présenté sous forme d'un troisième article.

*Merlier E., Hmimina G, Delpierre N., Berveiller D., Dufrêne E., Soudani K. (à soumettre).*

*PRI responses to climat drought conditions in a mature deciduous forest.*

Le dernier chapitre est une discussion et conclusion générale qui vise à la fois à mettre en exergue les principaux résultats obtenus et de les discuter à la lumière de la littérature scientifique correspondante. Cette discussion vise aussi à mettre en évidence les limites des résultats obtenus et les limites des approches mises en œuvre dans le cadre de cette thèse afin de dégager de nouvelles voies de recherche.



# **CHAPITRE I**

## **Le suivi du fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux**





# **Le suivi du fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux**

---

## **1. Fonctionnement carboné et hydrique des forêts : Principaux mécanismes et méthodes d'analyse de leur fonctionnement**

### **1.1. Le cycle du carbone et le fonctionnement carboné et hydrique des forêts**

Le carbone est le principal constituant des organismes vivants, résultant directement ou indirectement du mécanisme de la photosynthèse. On trouve le carbone minéral sous forme de dioxyde de carbone atmosphérique dans la biosphère terrestre, sous forme dissoute et sous forme de carbonates et de bicarbonates dans les océans, mais le principal stock de carbone minéral se trouve sous forme de roches calcaires, les plus abondantes des roches sédimentaires de la lithosphère. Quant au carbone organique, des stocks importants se trouvent dans les sols, les organismes vivants et les énergies fossiles. Le carbone dans les écosystèmes terrestres, végétation et sol compris, compte pour environ 2300 GtC, trois fois le stock de carbone atmosphérique, réparti à environ 30% dans la biomasse végétale et à 70% dans le sol. Les forêts représentent environ la moitié du carbone organique terrestre, dont un peu plus de la moitié dans le sol (56%) et le reste dans la biomasse (IPCC, 2001). Le transfert du carbone atmosphérique aux écosystèmes terrestres s'effectue grâce au processus de la photosynthèse, tandis que l'inverse est lié à la respiration et à la décomposition de la matière organique sous l'action des organismes vivants. Depuis environ un siècle et demi, l'impact des activités humaines sur l'environnement a pris une tournure inégalée. L'augmentation des rejets dans notre atmosphère de gaz dits « à effet de serre » tels que le dioxyde de carbone en

est un exemple préoccupant. En effet, suite à l'ère industrielle et l'utilisation des énergies fossiles en particulier, de grandes quantités de carbone ont été libérées dans l'atmosphère (Goudriaan, 1992) provoquant une augmentation exponentielle de la concentration en dioxyde de carbone atmosphérique passant de 280 ppm au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle à 390 ppm aujourd'hui. L'effet de serre qui en a résulté a conduit à une augmentation de la température globale d'environ  $0.13^{\circ}\text{C} \pm 0.03^{\circ}\text{C}$  par décade sur les cinquante dernières années (IPCC, 2007). Ce réchauffement affecte l'écosystème dans sa globalité (Harley et al, 1992) notamment en modifiant la température et le régime des pluies, mais aussi en jouant sur la productivité primaire brute (gross primary production, GPP) par son impact sur la photosynthèse des plantes, ainsi qu'en altérant la respiration des plantes et du sol.

L'importance des écosystèmes forestiers dans le cycle du carbone n'est plus à démontrer. Quant à la multiplicité des services produits par les forêts, elle en fait un écosystème clé de notre planète. Outre l'approvisionnement en bois, les forêts ont un rôle majeur en termes de réservoirs de biodiversité faunistique et floristique et permettent la régulation de la qualité des eaux et du climat par l'intermédiaire de la photosynthèse terrestre et de l'évapotranspiration. Les forêts contribuent fortement à l'atténuation de l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone atmosphérique. Les dernières estimations (Pia et al., 2011) montrent que les forêts stockent l'équivalent de 30% des émissions de carbone d'origine anthropique jouant ainsi un rôle de puits de carbone de même ampleur que celui joué par les océans.

Prédire les évolutions futures de la concentration en  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère et anticiper leurs impacts sur la biosphère est un des propos actuels majeurs d'étude de la communauté scientifique. Le rôle de puits ou de source de carbone et la productivité des écosystèmes sont modulés par les facteurs climatiques et anthropiques. Les changements climatiques génèrent une augmentation des températures dans l'hémisphère nord et conduit à un allongement de la saison de croissance (Menzel & Fabien, 1999 ; Lebourgeois et al., 2010). Sont attendus une

augmentation de la fréquence, de la durée et de l'intensité des événements climatiques tels que les sécheresses et les précipitations (Sheffield & Wood, 2008). Une augmentation de 40 à 60% de la concentration en ozone atmosphérique est prédite à l'horizon 2100 (Meehl et al., 2007). Il s'avère nécessaire de suivre et d'anticiper les conséquences de ces changements climatiques sur les écosystèmes continentaux, et notamment leurs impacts sur la photosynthèse, mécanisme clé du fonctionnement des végétaux et de l'ensemble de la chaîne alimentaire. Ces écosystèmes offrent principalement des réponses non-linéaires et fortement contrastées aux variations abiotiques. En effet, en fonction du milieu, la croissance des plantes et leur capacité à stocker le carbone sont fortement dépendantes des conditions abiotiques et des ressources disponibles. Le rendement de la photosynthèse dépend du facteur limitant du milieu et se mesure de différentes manières en fonction de l'écosystème considéré. Ainsi pour caractériser et mesurer la capacité de la plante à créer de la biomasse par la photosynthèse, différents indices sont utilisés en fonction des conditions du milieu limitant l'absorption de carbone. On trouve l'efficacité de la plante à utiliser l'eau disponible (water use efficiency, WUE) qui se définit comme la quantité de carbone absorbée ou stockée sur la quantité d'eau perdue par évapotranspiration. Les principaux nutriments essentiels au fonctionnement de la plante peuvent aussi limiter la croissance des plantes, il s'agit principalement des quantités d'azote, de phosphore et de potassium (NPK) disponibles dans le sol. L'azote du sol disponible pour la plante détermine sa croissance. L'efficacité de la plante à utiliser l'azote du sol (nitrogen use efficiency) est calculée comme la quantité de carbone absorbée ou stockée par rapport à la quantité d'azote du sol perdue (Berendse et al., 1987). On définit de la même manière l'efficacité de la plante à utiliser le phosphore du sol (phosphorus use efficiency) et l'efficacité de la plante à utiliser le potassium du sol (potassium use efficiency). Enfin, l'efficacité de la plante à utiliser la lumière (light use efficiency, LUE), et donc à utiliser le rayonnement, se calcule comme le ratio de la quantité de carbone absorbée ou stockée sur la quantité de rayonnement absorbée par la plante.

## 1.2. L'utilisation et la régulation de la lumière absorbée par les plantes

La lumière incidente qui arrive sur une feuille peut être réfléchiée, transmise, ou absorbée (Fig. 1).



Fig .1 : La lumière incidente (I) arrivant sur une feuille peut être réfléchiée (R), absorbée (A) ou transmise (T).

Les photons de lumière sont absorbés par les photosystèmes se trouvant dans les membranes thylakoïdales des chloroplastes. Les photosystèmes sont constitués de protéines et de pigments répartis en un centre réactionnel, composé de molécules de chlorophylle, et d'une antenne collectrice, formée de molécules de chlorophylles et de caroténoïdes (light harvesting complex, LHC), chargées de transmettre les photons vers le centre réactionnel (Fig. 2). On distingue deux photosystèmes qui interviennent successivement dans la photosynthèse, le photosystème II (PSII, composé des protéines LHCII) puis le photosystème I (PSI, composé des protéines LHCI).

Les molécules de chlorophylle possèdent des électrons délocalisés, liés à la présence de liaisons conjuguées, qui passent d'un état fondamental à un état excité lorsque la molécule capte un photon. La chlorophylle excitée retourne à son état fondamental, plus stable énergétiquement, de plusieurs manières différentes. En utilisant cette énergie dans le quenching photochimique (qP) ce qui correspond au processus de **photosynthèse**, afin de (1) transférer son énergie à une molécule proche puis de (2) perdre un électron lors de la photochimie, une autre manière pour la chlorophylle de retourner à son état fondamental et de

(3) réémettre de la lumière sous forme de **fluorescence**, ou de (4) libérer cette énergie par la voie de quenching non photochimique (NPQ), la **dissipation thermique**. Ces trois mécanismes sont intimement liés et se complètent dans une boucle d'autorégulation.

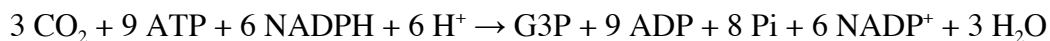
### 1.2.1. La photosynthèse

Concernant le mécanisme de la photosynthèse, il se déroule en deux étapes :

La phase photochimique, dépendante de la lumière, permet aux électrons d'être transportés à travers les photosystèmes afin de produire de l'ATP (énergie chimique) et du NADPH, H<sup>+</sup> (potentiel réducteur) :



La phase non photochimique, indépendante de la lumière, permet d'utiliser l'ATP et le NADPH, H<sup>+</sup> produits pour convertir le CO<sub>2</sub> et le H<sub>2</sub>O en glucides :



Comme illustré dans la Fig. 2, lors de la phase photochimique, l'absorption d'un photon (d'énergie hν) par une molécule de chlorophylle de l'antenne collectrice va permettre le transfert de l'énergie à une autre molécule de chlorophylle (1) et la transmission de l'énergie à la chlorophylle du centre réactionnel qui va perdre un électron dans la photochimie (2). La molécule de chlorophylle doit récupérer un électron suite à la photochimie (2), cela s'effectue grâce à la photolyse d'une molécule d'eau : la photolyse permet de scinder les molécules d'eau et ainsi de libérer protons, électrons et oxygène. L'électron perdu va transiter dans la membrane des thylakoïdes en suivant la chaîne de transport d'électrons jusqu'à sa récupération par son accepteur final, le NADP<sup>+</sup>. Les protons s'accumulent dans l'espace intra-thylakoïdien et participent à la génération d'un gradient de proton qui sont utilisés dans le mécanisme de l'ATP synthase, l'oxygène est libéré comme déchet (Fig. 3).

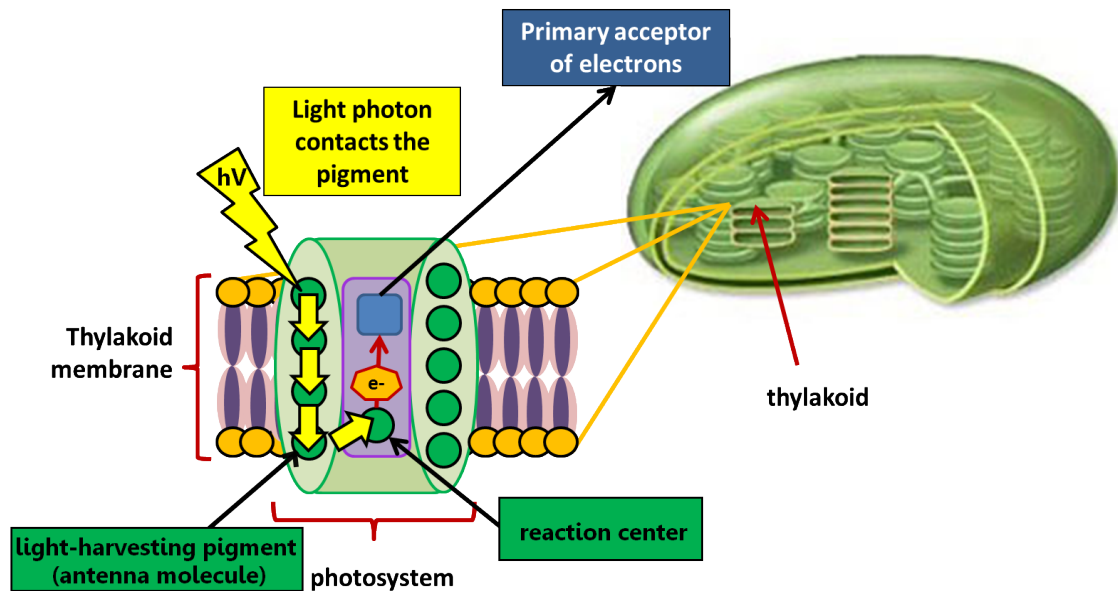


Fig. 2 : Schéma simplifié de l'absorption d'un photon ( $hV$ ) par une molécule de chlorophylle de l'antenne collectrice, et de sa transmission jusqu'au centre réactionnel du photosystème II. Le centre réactionnel perd un électron qui va rejoindre son accepteur primaire (phéophytine) avant d'entrer dans la chaîne de transport d'électron.

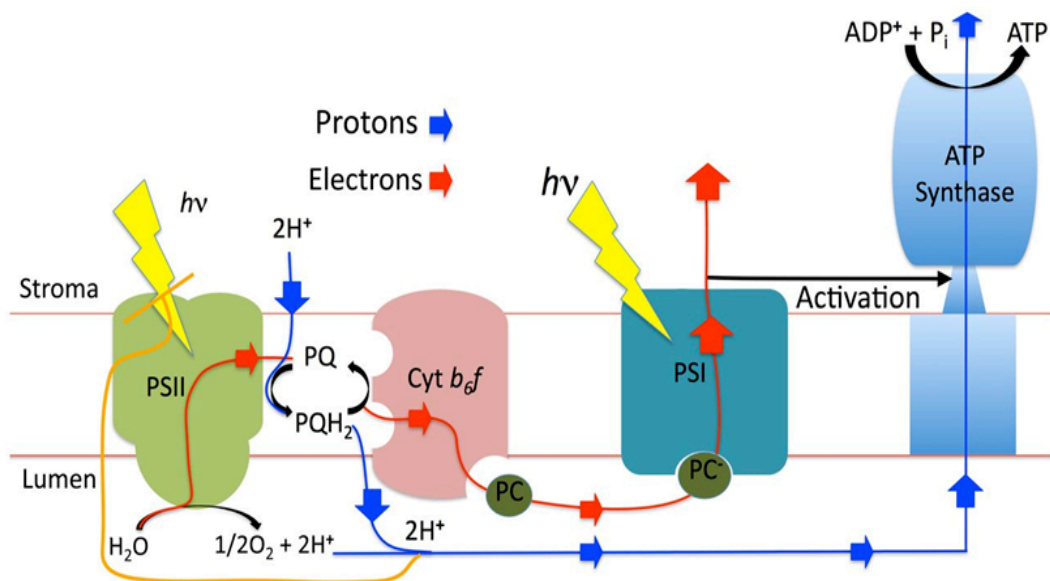


Fig. 3 : Schéma simplifié du trajet des protons et des électrons lors de la photosynthèse au sein de la membrane thylacoïdale d'une feuille (d'après Zaks et al., 2012).

Plus précisément, la chaîne de transport d'électrons qui a lieu dans la membrane des thylakoïdes s'effectue en premier lieu dans le photosystème II (PSII), à partir de la molécule de chlorophylle excitée (P680\*). Le transport s'effectue des transporteurs à bas potentiel de

réduction (réducteurs) aux transporteurs à fort potentiel de réduction (oxydants) en commençant par P680\*. L'accepteur primaire de cet électron est la phéophytine, puis il passe par plusieurs accepteurs jusqu'au complexe de cytochrome b6f avant d'être transporté vers une molécule de plastocyanine (PC) jusqu'à la molécule de chlorophylle (P700) du photosystème I (PSI). Ce flux d'électrons génère un gradient de concentration en protons et un gradient électrochimique qui est utilisé par la pompe à protons (ATP synthase) pour phosphoryler de l'ADP en ATP. Cet ATP formé sera utilisé dans le cycle de Calvin afin de créer les composés organiques nécessaires au fonctionnement et à la croissance de la plante.

Chez toutes les plantes, la phase non-photochimique débute par la carboxylation du CO<sub>2</sub> grâce à l'enzyme clé, la RubisCO (ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase), qui comme son nom l'indique, a une affinité pour le CO<sub>2</sub> ainsi que pour l'O<sub>2</sub>. La RubisCO permet de fixer le CO<sub>2</sub> sur une molécule (le ribulose biphosphate, RuBP) dans le cycle de Calvin grâce aux molécules d'ATP et de NADPH, H<sup>+</sup> produites au cours de la phase photochimique. Cette réaction produit un substrat qui va être réduit afin de synthétiser des glucides. Le RuBP est ensuite régénéré pour un nouveau cycle (Fig. 4).

Il existe différents mécanismes de carboxylation, ce qui permet de classer les végétaux en 3 catégories (Fig. 5): Les plantes en C3, les plantes en C4 et les plantes CAM, ces classes étant déterminées par le nombre d'atomes de carbone de la première molécule organique formée lors de la fixation du CO<sub>2</sub>.



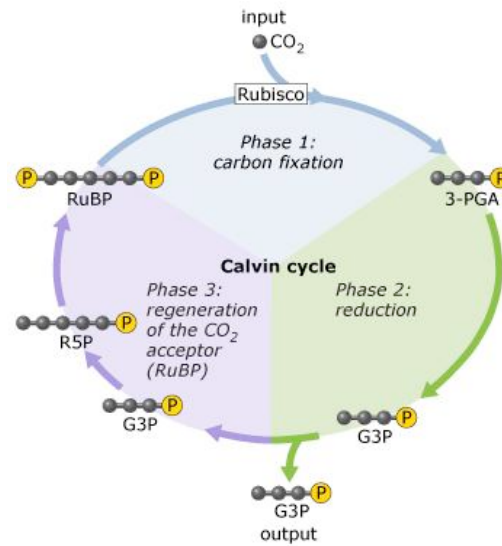


Fig. 4 : Schéma simplifié distinguant les trois étapes du cycle de Calvin : la fixation du carbone grâce à la RubisCO, la réduction du carbone pour la synthèse des glucides, et la régénération du substrat RuBP pour un nouveau cycle.

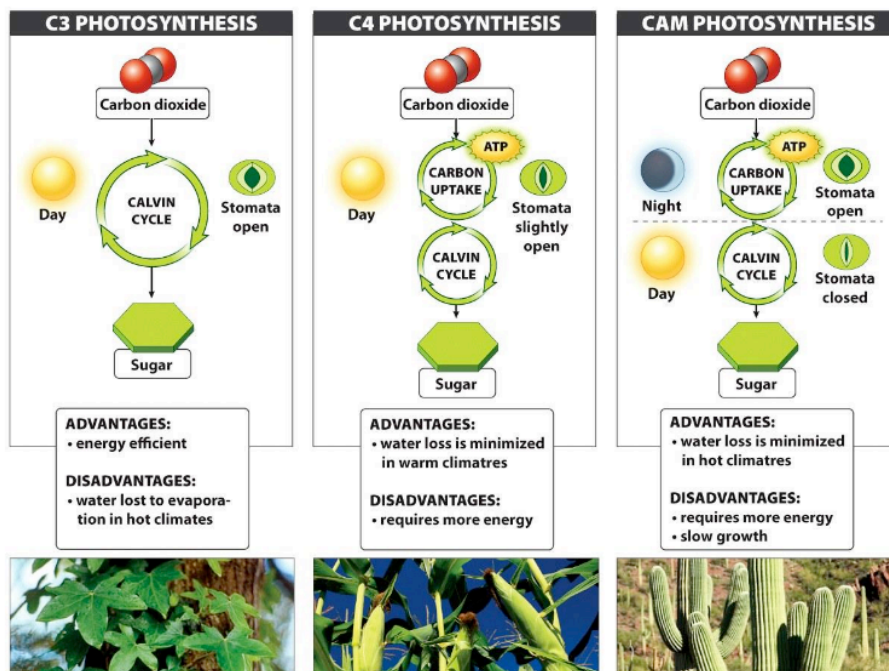


Fig. 5 : Schéma du fonctionnement de la phase non-photochimique de la photosynthèse pour les plantes au métabolisme en C3, C4 et CAM.

La majorité des plantes possède un fonctionnement en C3. Il s'agit du mécanisme le plus primitif (~3 milliards d'années, Sage & Monson, 1999), adapté à un environnement riche en CO<sub>2</sub> et en eau. La RubisCO incorpore une molécule de CO<sub>2</sub> dans un composé en C5 (RuBP) afin de former deux molécules d'acide phosphoglycérique (APG) constitué de 3 carbones chacune (C3) qui sont utilisées dans le cycle de Calvin. La RubisCO incorpore aussi de l'O<sub>2</sub> par sa fonction oxygénase. Compte tenu de l'importante concentration atmosphérique en O<sub>2</sub>, la photorespiration fonctionne de paire avec la photosynthèse et diminue le rendement de la photosynthèse en dégradant une partie des sucres formés. Cette activité oxygénase augmente avec la température. Les plantes en C3 sont particulièrement sensibles aux stress abiotiques car leur optimum de photosynthèse est limité par la température et la disponibilité en eau.

Les plantes au métabolisme C4 sont moins répandues, plus récentes (~30 millions d'années, Sage & Monson, 1999) et sont présentes dans les environnements secs et chauds car la voie métabolique qu'elles utilisent leur permet d'augmenter leur capacité photosynthétique. Ce mécanisme implique deux types cellulaires distincts pour la carboxylation : les cellules du mésophile et les cellules de la gaine péri-vasculaire. Le CO<sub>2</sub> capté par les plantes est fixé par une première enzyme, la phosphoénol-pyruvate carboxylase (PEPcase) qui n'a pas d'affinité avec l'O<sub>2</sub>, dans une cellule spécialisée du mésophile. Cette réaction permet de synthétiser un composé en C4 qui est transféré dans une cellule de la gaine péri-vasculaire où a lieu le cycle de Calvin. Cette voie permet aux plantes en C4 de concentrer le CO<sub>2</sub> dans une cellule avant de l'utiliser pour la synthèse de glucide ce qui permet de rendre nulle l'activité photorespiratoire qui est préjudiciable au rendement de la photosynthèse.

Enfin, les plantes de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism) sont adaptées aux conditions désertiques. Ces plantes possèdent les deux enzymes, la RubisCO et la PEPcase, ce qui leur confère un fonctionnement similaire aux plantes C4 et une résistance aux stress. Cependant, la fixation du CO<sub>2</sub> lors de la phase non photochimique de la photosynthèse n'est

pas séparée dans l'espace comme les plantes en C4 (mésophylle/gaine périvasculaire) mais dans le temps. Leurs stomates sont ouverts pendant la nuit, période pendant laquelle elles concentrent le CO<sub>2</sub> dans leurs cellules. Le cycle de Calvin a ensuite lieu pendant la journée (car il nécessite de l'ATP et du NADPH, H<sup>+</sup> synthétisé lors de la phase photochimique de la photosynthèse) et est réalisé avec le stock de CO<sub>2</sub> assimilé la nuit. Ainsi, ces plantes n'ont pas besoin d'ouvrir leurs stomates la journée, ce qui réduit énormément les pertes en eau et augmente leur résistance aux contraintes abiotiques.

L'efficacité de la plante à utiliser la lumière (light use efficiency, LUE) peut donc varier selon les espèces et en réponse aux interactions de nombreux facteurs abiotiques qui limitent la photosynthèse au niveau de la phase photochimique et/ou de la phase non-photochimique, ce qui complexifie la compréhension du fonctionnement carboné des plantes.

### **1.2.2. La fluorescence**

Une partie de la lumière absorbée qui n'est pas utilisée dans l'appareil photosynthétique est perdue sous forme de fluorescence chlorophyllienne (2 à 3% de la lumière totale absorbée). La fluorescence a lieu au niveau du transport d'électrons dans la membrane des thylakoïdes et dépend de l'encombrement de la chaîne de transfert d'électrons. Lorsqu'un accepteur d'électron de la chaîne est oxydé, il peut accepter un électron, il est dit « ouvert ». Au contraire, lorsqu'un accepteur est réduit et ne peut plus accepter d'excitation, il est dit « fermé ». La fermeture des centres entraîne une augmentation de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne. Cette fluorescence témoigne de la perte d'énergie au cours du transfert d'excitation jusqu'aux centres réactionnels des photosystèmes et dépend de la proximité (liée aussi à la concentration) de chlorophylle dans les antennes collectrices. Ainsi, lorsque la feuille est adaptée à l'obscurité et qu'elle est exposée à une lumière à très forte intensité, le PSII absorbe l'énergie incidente, la totalité de ses centres sont réduits et il n'est plus capable d'accepter un nouvel électron tant que ses centres ne se sont pas réouverts. Cela

induit une forte augmentation de la fluorescence et une diminution de la photosynthèse, c'est la fluorescence maximale de la feuille ( $F_m$ ) (Fig. 6). Le NPQ (non photochemical quenching) dissipe l'énergie excédentaire absorbée et permet à la fluorescence d'atteindre un état stationnaire ( $F_s$ ). Cette fluorescence, dite aussi variable ( $F_v$ ), provient essentiellement de l'antenne collectrice du PSII (Kraus & Weis, 1991). La fluorescence du PSI est faible, ne varie pas et contribue seulement à 6% de l'émission totale dans le proche infrarouge et 1 à 2% dans le rouge (Moya et al., 2004). La fluorescence chlorophyllienne est principalement émise par la chlorophylle (a) dans les longueurs d'onde 650-665 nm alors que la chlorophylle (b) émet dans les longueurs d'onde de 710-720 nm.

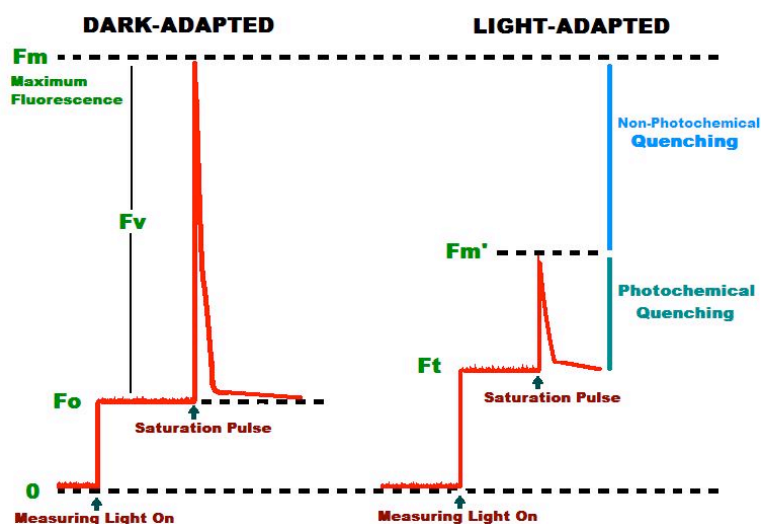


Fig. 6 : Schéma des différentes variables mesurables par fluorescence en fonction de l'état d'adaptation à la lumière de la feuille étudiée.

La mesure de fluorescence chlorophyllienne active permet d'obtenir différents paramètres physiologiques, tels que  $F_m$  et  $F_s$ . Suivant les conditions lumineuses, il est possible de mesurer la fluorescence à l'obscurité ( $F_o$ ), en apportant une lumière très faible qui n'induit pas de changement d'activité photosynthétique. La valeur  $F_o$  correspond à la fluorescence lorsque tous les centres sont ouverts et est sensible aux facteurs affectant la structure des antennes. Le rendement photochimique optimal ( $F_v/F_m$ ), correspondant à l'efficacité de capture des électrons par les centres réactionnels, peut alors se calculer comme suit :

$$Fv/Fm = \frac{Fm - Fo}{Fm}$$

Le rendement photochimique optimal se situe entre 0.80 et 0.86 en conditions de photosynthèse favorable (Bjorkman & Demmig, 1987, Genty et al., 1989). En conditions réelles cette valeur de rendement photochimique optimal n'est pas atteinte. En effet, à la lumière, des processus de désactivation liés au fonctionnement de l'activité photosynthétique se mettent en place. Ainsi, on calcule le rendement photochimique effectif (Y(II)) en utilisant la valeur de fluorescence maximale de la feuille exposée à la lumière (Fm') et la fluorescence stationnaire (Fs).

$$Y(II) = \frac{Fm' - Fs}{Fm'} = \frac{\Delta F}{Fm'}$$

En parallèle, la valeur du NPQ correspondant aux mécanismes de photoprotection liés à la dissipation de chaleur, se calcule ainsi :

$$NPQ = \frac{Fm - Fm'}{Fm'}$$

Cependant, la mesure de fluorescence active nécessite d'utiliser un fluoromètre servant à la fois de sources de lumière modulée et de récepteur des émissions par fluorescence rendant cette méthode, dite active, inadaptée pour l'étude à large échelle. Une autre méthode de mesure de fluorescence a été développée et consiste à utiliser les données spectrales de réflectance pour estimer la fluorescence émise par les plantes. En conditions naturelles, cette méthode de mesure de la fluorescence passive consiste à utiliser les lignes de Fraunhofer (discontinuités observables du spectre solaire liées notamment à l'absorption du rayonnement par les constituants de la couronne solaire et de l'atmosphère) et plus particulièrement les longueurs d'onde liées à l'absorption de l'oxygène (bande O2-A à 760 nm et bande O2-B autour de 680 nm, Fig. 7). Le flux de fluorescence induit par le rayonnement solaire (Solar

Induced Fluorescence, SIF) dans ces deux longueurs d'onde est directement lié à l'activité photosynthétique de la végétation (Yang et al., 2015). Cependant, d'après les études menées et répertoriées dans Meroni et al. (2009), le signal de fluorescence mesuré dépend de nombreux paramètres exogènes (conditions de mesures) et endogènes propres au couvert végétal, en particulier sa structure, ce qui ajoute de la variabilité au signal de fluorescence mesuré et rend difficile son interprétation et son lien avec l'activité photosynthétique des plantes.

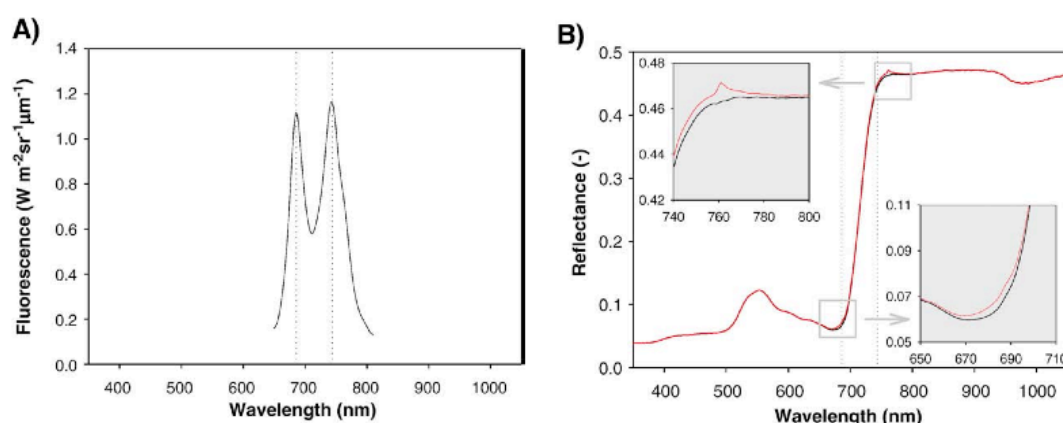


Fig. 7 : Florescence chlorophyllienne induite par le soleil (SIF) et spectres de réflectance d'une feuille.

(A) Spectre de la feuille entre 650 et 800 nm avec les deux pics de fluorescence dans les bandes d'absorption de l'oxygène atmosphérique à 680 et 760 nm. (B) Mise en évidence de la fluorescence chlorophyllienne dans les bandes d'absorption de l'oxygène (d'après Meroni et al. 2009).

### 1.2.3. La dissipation thermique

L'excès de lumière absorbée par le PSII peut être libéré par la voie de dissipation thermique (Butler, 1978 ; Baker, 2008 ; Verhoeven, 2014), qui est une voie de dissipation non photochimique. L'excès d'énergie absorbée ne peut pas être utilisé dans la photosynthèse car la pompe à ATP est dans l'incapacité d'utiliser la totalité des protons formés, ce qui conduit à une accumulation de protons dans le lumen des thylakoïdes et à une diminution du pH (Fig. 8). En parallèle, les protéines du LHCII (Light Harvesting Complexe II) changent de conformation et s'agglomèrent. La diminution du pH du lumen active le cycle des

xanthophylles, pigments de la famille des caroténoïdes, qui ont un rôle protecteur des photosystèmes des cellules. L'enzyme de dé-époxydation (violaxanthin de-epoxydase, VDE) est activée lorsque le pH du lumen s'abaisse à 5.8 et convertit la violaxanthine en anthéroxanthine, puis en zéaxanthine. L'agglomération des protéines LHCII couplée au contenu en zéaxanthine permettent d'augmenter la rigidité de la membrane et la dissipation de l'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. Lorsque la lumière incidente diminue et que la concentration en protons accumulés dans la membrane des thylakoïdes diminue grâce à la pompe à ATP, le pH et l'activité photosynthétique augmentent.

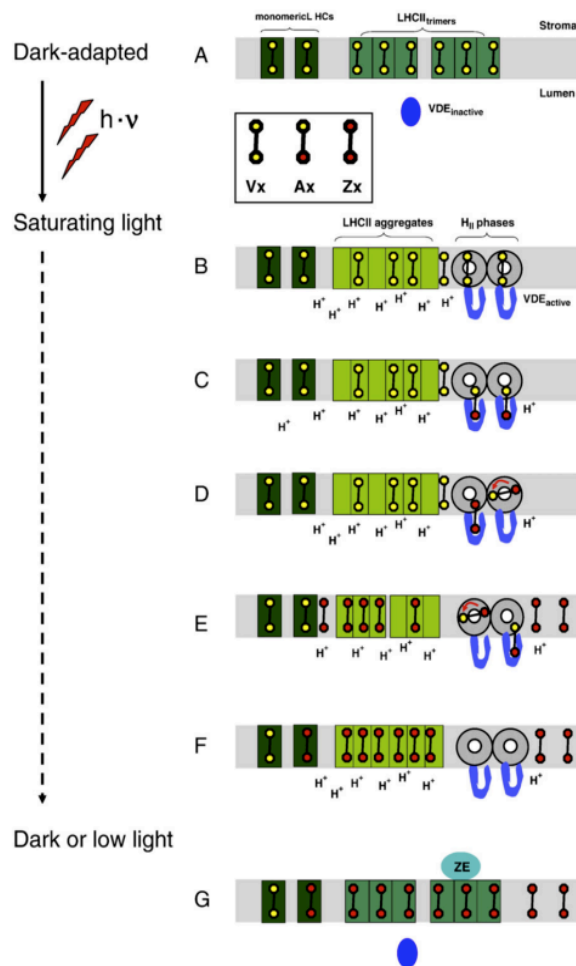


Fig. 8 : Schéma de la conversion de la violaxanthine en anthéroxanthine et en zéaxanthine dans les thylakoïdes via le cycle des xanthophylles en réponse à un excès de lumière.

Ces trois mécanismes (Photosynthèse, fluorescence et dissipation thermique) fonctionnent de concert dans la boucle de régulation de l'appareil photosynthétique, avec l'implication plus ou moins importante de chacun en fonction de l'état physiologique dans lequel se trouve la feuille (stress hydrique, oxydatif, thermique) et des rétroactions associées (Fig. 9). En cas d'excès de lumière chronique, l'énergie excédentaire absorbée par les antennes collectrices du PSII peut causer de graves dommages aux photosystèmes et par extension à la feuille et à la plante. Cette énergie excédentaire peut engendrer des dommages photo-oxydatifs aux photosystèmes ainsi qu'à un grand nombre d'autres composants cellulaires essentiels, notamment par la formation d'espèces réactives d'oxygènes (reactive oxygen species, ROS) telles que l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyde ( $OH^-$ ) (Catagna & Ranieri, 2009).

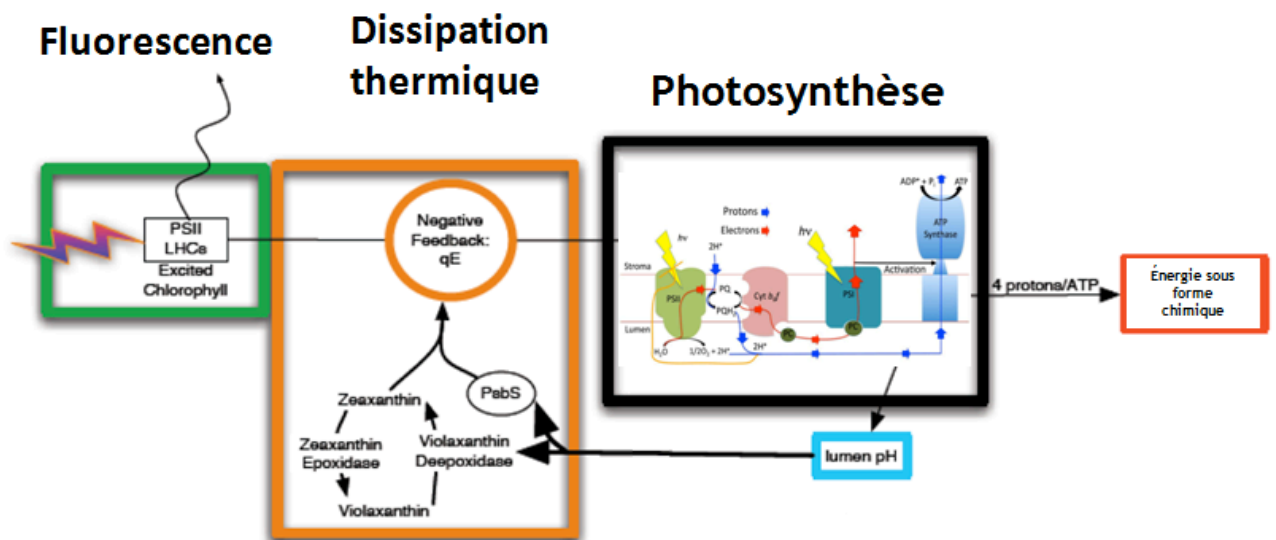


Fig. 9 : Schéma général des processus de dissipation de l'énergie lumineuse par les plantes (modifié à partir de Zaks et al., 2012).

En fonction des conditions du milieu et des facteurs limitant leur capacité photosynthétique, les plantes régulent leur photosynthèse et la lumière absorbée est plus ou moins réémise par fluorescence et par dissipation thermique.



Tous les stress subis par la plante, tels que les températures extrêmes et les sécheresses, entraînent une baisse du rendement de la photosynthèse et produisent un déséquilibre dans la capture et l'utilisation de l'énergie lumineuse. La surexcitation des photosystèmes peut conduire à des lésions de l'appareil photosynthétique ce qui altère la capacité photosynthétique des feuilles (Powles et al., 1984). A ces réponses physiologiques de la plante face aux stress peuvent s'ajouter des dommages propres à la contrainte imposée. C'est le cas de l'ozone qui, au contact des parois cellulaires, se décompose spontanément en espèces oxygénées réactives (ROS) incluant des radicaux libres ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{O}_3^-$ ) et des sous-produits oxydants ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) par de multiples mécanismes chimiques (Moldau, 1998 ; Pell et al., 1997 ; Gill & Tuteja, 2010). L'oxydation de la structure intracellulaire par les ROS crée les premières lésions foliaires. Ces dégâts sont amplifiés dans le cas d'une exposition intense (lié à des pics élevés occasionnels d'ozone). Le stress provoqué par une exposition chronique dégrade la photosynthèse et accélère la sénescence foliaire. Bagard et al. (2008) ont étudié l'impact de 120 ppb d'ozone pendant 35 jours d'exposition sur de jeunes peupliers et ont mesuré une réduction moyenne de 30% de l'assimilation nette de  $\text{CO}_2$ . L'ozone peut aussi entraîner soit la fermeture des stomates, ce qui empêche l'eau de s'échapper lors de l'évapotranspiration, soit au contraire provoquer leur ouverture, ce qui amplifie la perte d'eau par la plante (Mills et al., 2013).

L'ordre et l'importance des stress appliqués peuvent aussi impacter la réponse des plantes. Un stress hydrique précédant un stress oxydatif peut limiter les influx d'ozone et réduire les dommages phyto-toxiques grâce à la fermeture stomatique induite par le stress hydrique (Fuhrer, 2009 ; Fagnano et al., 2009). Cependant le stress hydrique ne protège pas systématiquement les espèces les plus sensibles à l'ozone ou celles plus résistantes au stress hydrique (Mills et al., 2009 ; Wagg et al., 2012).

Le passage à la saison hivernale peut aussi être considéré comme un stress pour les plantes. A l'inverse des espèces caduques qui perdent leur feuilles suite aux baisses de température et de photopériode, les espèces sempervirentes préviennent la perte d'activité photosynthétique de la période hivernale en subissant un durcissement au froid (Levitt, 1980 ; Vogg et al., 1998 ; Bigras et al., 2001). Cette résistance au froid est le résultat d'un réarrangement des pigments xanthophylles (Ottander et al., 1995), ainsi que d'une augmentation durable du contenu en caroténoïdes (Björkman & Demmig-Adams, 1994 ; Verhoeven et al., 1999). En parallèle, le contenu en chlorophylle des feuilles diminue. Comme vu dans le paragraphe précédent, le cycle des xanthophylles permet une régulation du transport d'électrons en conditions de stress de courte période. Lors de la période hivernale, chez les espèces sempervirentes, le contenu total en xanthophylle augmente et la dé-époxydation du pool de violaxanthine en zeaxanthine n'est pas réversible quotidiennement mais se maintient pour la saison. Ce changement de composition biochimique hivernal, bien qu'encore mal connu, permet une dissipation thermique continue par les caroténoïdes et des xanthophylles (Ruban et al., 2012 ; Verhoeven, 2014). Au printemps, lorsque les températures sont plus hautes et la photopériode plus longue, ces modifications structurales et biochimiques de résistance s'inversent et la photosynthèse reprend normalement (Vogg et al., 1998 ; Ottander et al., 1995). Ce mécanisme de protection hivernal permet souvent à ces espèces sempervirentes d'être plus résistantes aux différents stress que d'autres espèces caduques.

## **2. Les méthodes d'analyse du fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux en conditions naturelles**

### **2.1. L'analyse des échanges gazeux entre atmosphère et écosystème**

Plusieurs réseaux d'études ont été développés afin de suivre l'évolution des échanges gazeux entre atmosphère et écosystèmes continentaux, mais aussi les échanges de vapeur

d'eau, d'énergie et plus généralement des cycles biogéochimiques. Le réseau mondial FLUXNET (<http://fluxnet.ornl.gov/>) et français SOERE (<http://www.gip-ecofor.org/f-ore-t/index.php>) en font partis. Ces réseaux sont implantés au niveau mondial et œuvrent à la compréhension des processus qui gouvernent le fonctionnement des écosystèmes forestiers. Des tours à flux sont implantées au-dessus des canopées des nombreux écosystèmes du réseau et les méthodes issues de mesures à très haute fréquence des concentrations en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O simultanément aux mouvements de l'air, dites d'eddy-covariance, sont utilisées afin de mesurer en continu les échanges gazeux, avec une résolution temporelle semi-horaire et une résolution spatiale allant jusqu'au km<sup>2</sup>. Si ces méthodes permettent de caractériser d'une manière quantitative relativement précise le fonctionnement carboné et hydrique des écosystèmes dans lesquels ils sont placés, elles ne constituent que des sous-échantillons qui ne sont pas extrapolables à l'échelle des biomes (Jung et al., 2009) et elles ne permettent pas la prise en compte de toute la diversité des écosystèmes et de leur grande hétérogénéité spatiale.

## **2.2. L'emploi de la modélisation pour le suivi du fonctionnement des écosystèmes**

Toutes les données mesurées récoltées *in situ* sont utilisées afin de calibrer des modèles qui permettent d'approfondir la description du fonctionnement des écosystèmes. Grâce à la mise en relation de ces différentes données acquises sur le terrain et des variables climatiques correspondantes, il est possible d'estimer et de prédire les évolutions futures de ces cycles. La mise en équation des mécanismes physiques et biologiques impliqués dans ces échanges permet de concevoir des modèles mécanistes complexes permettant pour certains la prédiction et aidant à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème considéré à des échelles fines (Hanson et al., 2004). Les modèles de flux de carbone sont des outils importants pour comprendre les processus qui régissent l'évolution des réservoirs de carbone (Baldocchi et al. 2000). Ils permettent notamment d'estimer le comportement des écosystèmes face aux

scénarios de variations de température, de précipitations, de concentration en CO<sub>2</sub>, ainsi que de l'enrichissement en azote (Baldocchi et al. 1996).

Ainsi le modèle CASTANEA (Dufrêne et al., 2005), modèle mécaniste à base de processus physiologiques et physiques, permet de simuler les flux et les stocks de carbone, d'eau et d'énergie à l'échelle de la parcelle forestière. Ce modèle permet de décrire précisément le fonctionnement du couvert grâce à de nombreux sous-modèles et un jeu considérable de paramètres relatifs notamment aux mécanismes physiologiques et physiques considérés, à la structure du couvert, en particulier son indice foliaire et sa distribution, et aux propriétés spectrales et biochimiques foliaires. Le modèle MAESTRA (Medlyn, 2003) permet de comprendre les interactions entre arbres dans un peuplement, et en particulier leur compétition pour la lumière, et de simuler la photosynthèse et l'évapotranspiration de chaque arbre. D'autres modèles tels que ORCHIDEE (Krinner et al., 2005) et BIOME-BCG (White et al., 2000) permettent de reproduire plus ou moins efficacement un comportement moyen des couverts végétaux, à l'échelle régionale et globale, de par leur représentation simplifiée des couverts végétaux en groupes fonctionnels (feuillus, résineux, prairies, etc.) caractérisés chacun par un jeu de paramètres identiques.

### **2.3. La télédétection comme proxy du fonctionnement des couverts végétaux**

La télédétection optique est un outil puissant de par son potentiel à haute résolution temporelle et spatiale permettant d'étudier, à l'aide de mesures optiques, les caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques des végétaux, depuis la feuille jusqu'au globe.

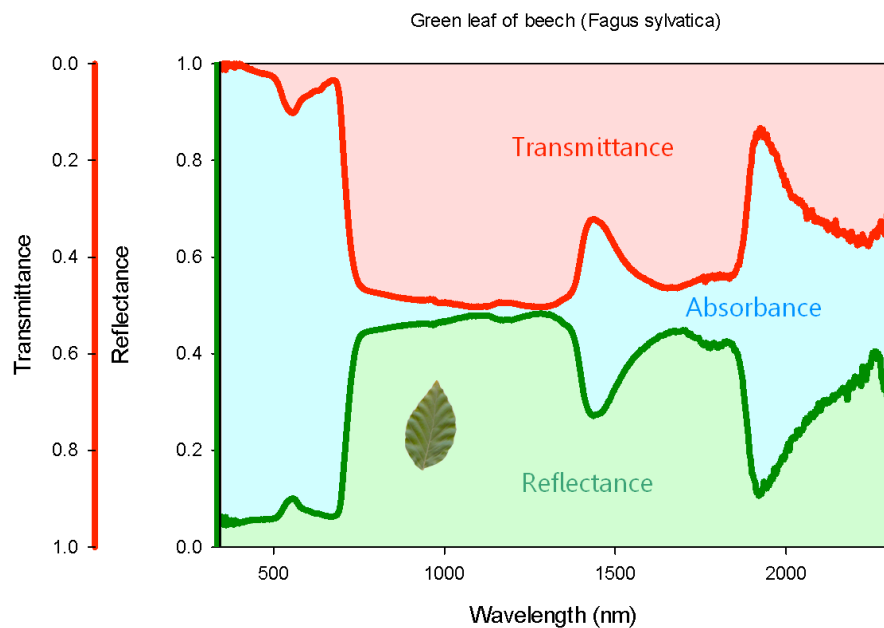


Fig. 10 : spectres de réflectance et de transmittance d'une feuille de hêtre commun.

La télédétection permet de mesurer la lumière transmise et réfléchié et de calculer la lumière absorbée par le couvert ou la feuille (Fig. 10). Le caractère non destructeur de cette approche ajoute un intérêt considérable et permet de suivre, aussi bien de l'échelle de la feuille à celle des écosystèmes, l'action des différents facteurs environnementaux biotiques et abiotiques sur les végétaux. En télédétection basée sur l'exploitation du rayonnement réfléchi, l'information spectrale acquise permet de renseigner sur la structure des couverts végétaux (Verstraete et al., 1996) et leur composition biochimique (Sims & Gamon, 2002). La construction d'indices spectraux combinant deux ou plusieurs mesures de réflectance dans des longueurs d'onde précises impactées par un phénomène d'intérêt ont été développés. Ainsi des indices comme le Normalized Difference Vegetation Index (NDVI, Eq.1) et le Enhanced Vegetation Index (EVI, Eq.2) (Huete et al., 2002) sont utilisés pour décrire la structure des couverts végétaux en lien avec le rayonnement absorbé utile à la photosynthèse (PAR) et l'indice foliaire (LAI) (Soudani et al., 2006) alors que des indices comme le Modified Normalized Difference Index ( $mNDI_{705}$ , Eq.3) (Sims and Gamon, 2002) sont utilisés pour approximer la biochimie de la feuille et en particulier le contenu en chlorophylle de la feuille

et du couvert végétal. D'autres indices comme le Photochemical Reflectance Index (PRI, Eq.4) sont utilisés pour suivre le fonctionnement physiologique des plantes.

$$NDVI = \frac{(\rho_{NIR} - \rho_{red})}{(\rho_{NIR} + \rho_{red})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$EVI = \frac{2.5 \times (\rho_{NIR} - \rho_{red})}{(\rho_{NIR} + 6 \times \rho_{red} - 7.5 \times \rho_{blue} + 1)} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$mNDI_{705} = \frac{(\rho_{750} - \rho_{705})}{(\rho_{750} + \rho_{705} - 2 \times \rho_{445})} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$PRI = \frac{(\rho_{531} - \rho_{570})}{(\rho_{531} + \rho_{570})} \quad (\text{Eq. 4})$$

Avec  $R_{445}$ ,  $R_{531}$ ,  $R_{570}$ ,  $R_{705}$  et  $R_{750}$  pour la réflectance dans les bandes de longueurs d'onde 445, 531, 570, 705 et 750 respectivement. NIR et red correspondent respectivement à des bandes larges dans les longueurs d'onde correspondant aux portions du proche infrarouge et du rouge du spectre réfléchi.

Bien qu'en plein essor, le recours à la télédétection est relativement récent et les études se sont principalement intéressées au suivi des propriétés structurales et biochimiques des couverts car elles se manifestent souvent par des variations significatives de la réflectance. C'est le cas des plates-formes satellitaires tels que MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer, Zhang et al. 2003) qui permettent de quantifier la lumière réfléchie par les couverts végétaux afin de suivre entre autres le PAR absorbé, le LAI et le taux de couverture des peuplements végétaux. Le suivi des mécanismes écophysologiques en lien avec le fonctionnement carboné ou hydrique des espèces végétales par télédétection utilisant les propriétés de la réflectance n'en est encore qu'aux prémises et beaucoup d'études cherchent à évaluer la force du lien entre les propriétés optiques de la végétation et son état de fonctionnement physiologique, et en particulier son fonctionnement photosynthétique.

## 2.4. Un indice spectral prometteur : le PRI

Comme indiqué plus haut, de nombreux indices spectraux sont construits pour suivre l'état de la végétation. Les indices NDVI, EVI ou  $mNDI_{705}$  permettent de suivre l'état physiologique du couvert et sont associés à des changements de propriétés structurales et biochimiques du couvert. Cependant, lorsque ces propriétés du couvert changent et deviennent détectables par ces indices, les dommages sur les plantes sont déjà apparents (nécrose, défoliation, flétrissement). Les stress abiotiques impactent le niveau de photosynthèse avant que des symptômes n'apparaissent au niveau des feuilles, il s'avère donc primordial de pouvoir suivre le taux de photosynthèse des couverts afin de détecter précocement leurs réponses aux contraintes environnementales, et cela avant l'apparition des symptômes sévères. De tous les indices spectraux utilisant les propriétés de réflectance, le PRI développé par Gamon et al. (1990) est le seul indice spectral montrant un lien direct avec des mécanismes physiologiques clairement identifiés (Gamon et al. 1992 ; 1997 ; Sarlikioti et al. 2010 ; Isoda A. 2005 ; Suárez et al. 2008 ; Inoue & Peñuelas. 2015). De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre le cycle des xanthophylles et son niveau de dé-époxydation et les variations du PRI (Gamon et al., 1990 ; Gamon & Surfus, 1999 ; Fillela et al., 1996 ; Peguero-Pina et al., 2008). En effet, le PRI est directement lié au cycle des xanthophylles, ce qui lui confère une capacité à être utilisé en tant que proxy de l'efficacité de la plante à utiliser la lumière absorbée. Cela a été démontré dans des études précédentes mettant en lien le PRI et la LUE (Gamon et al., 1992; Peñuelas et al., 1995; Stylinski et al., 2002, Hmimina et al. 2013 ; 2015, Annexe 2 ; Soudani et al. 2014).

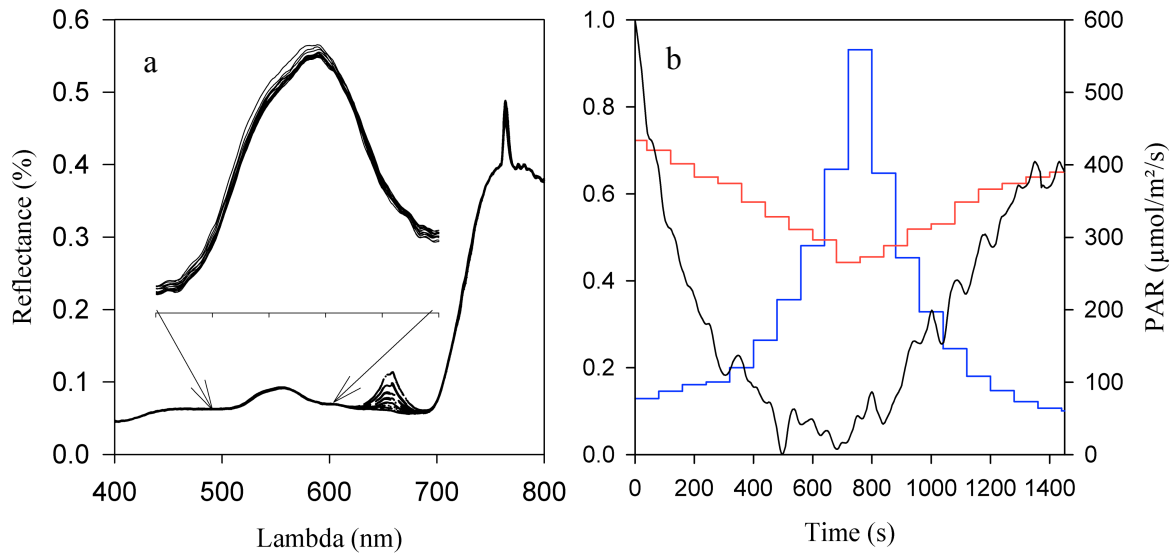


Fig. 11 : (a) - Série temporelle des spectres de réflectance mesurés sur la même feuille sous un PAR qui augmente puis qui diminue. L'insert permet d'agrandir la zone autour de 550 nm. (b)- Dynamique du PRI (en noir) et du rendement de la fluorescence (en rouge) en réponse à la séquence de PAR imposée (en bleu,  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), issue de la même série que (a) (Hmimina et al., 2013).

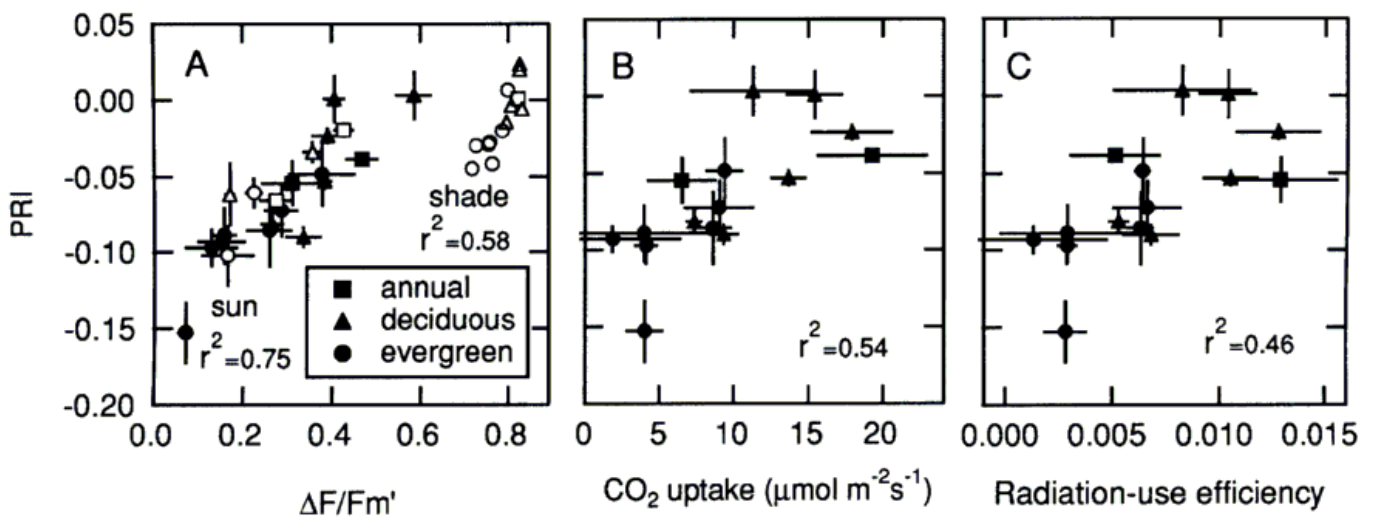


Fig. 12 : (A) Relation entre le PRI et rendement photochimique effectif de fluorescence, (B) relation entre le PRI et la concentration de  $\text{CO}_2$  absorbée, et (C) le relation entre le PRI et le taux net de  $\text{CO}_2$  utilisé par les feuilles (mesures effectuées sur des feuilles de lumières de 15 espèces ayant grandi en conditions de lumière et de nutrition optimales), (Gamon et al., 1997).



Plus précisément, l'indice spectral du PRI exploite les propriétés de réflectance dans des bandes étroites situées autour de 531 nm en lien avec les pigments xanthophylles qui ont la propriété d'absorber dans la longueur d'onde 505 nm et de réfléchir à 531 nm en fonction de leur niveau de dé-époxydation (Fig. 11).

D'un point de vue physiologique, le cycle des xanthophylles s'active lorsque la lumière absorbée augmente et la violaxanthine se convertit en zéaxanthine entraînant une diminution de la réflectance à 531 nm. Cette réponse est avérée pour un grand nombre d'espèces comportant différentes morphologies foliaires (Gamon et al., 1990, 1992 ; Peñuelas et al., 1993, 1995 ; Hmimina et al., 2013 ; Peguero-Pina et al., 2013) et s'est vérifiée avec les indicateurs de mesure de fluorescence (notamment  $\Delta F/F_m'$  qui permet de suivre l'état de stress des plantes, Weng et al., 2006) (Fig. 12).

L'efficacité de la plante à utiliser la lumière (LUE), et par extension la photosynthèse, est liée à l'état de dé-époxydation du cycle des xanthophylles (DEPS) ce qui permet l'emploi du PRI comme proxy du NPQ (Weng et al., 2006) et de la LUE (Fillela et al., 1996 ; Gamon et al., 1992 ; Gamon & Qiu, 1999 ; Peñuelas et al., 1995 ; Stylinski et al., 2002). La corrélation entre PRI et DEPS a été validée dans des travaux portant sur le suivi diurne de l'état de dé-époxydation des xanthophylles et du PRI à l'échelle foliaire (Ripullone et al., 2011). La variabilité journalière du PRI est corrélée à celle de la photosynthèse et de la conductance stomatique, et présente une dépression lorsque le soleil est au zénith qui est plus ou moins accentuée suivant l'âge de l'arbre, et cela à l'échelle de la feuille et du couvert (Gamon & Bond, 2013).

Un suivi de l'activité des xanthophylles, permet d'accéder à la capacité photosynthétique des feuilles. Le suivi du cycle des xanthophylles, par l'intermédiaire du PRI, peut permettre de suivre les changements de la distribution d'énergie lumineuse au sein du système photosynthétique en fournissant indirectement une mesure sur le changement à court terme de

l'efficacité de la plante à utiliser la lumière (LUE) (Gamon et al., 1992, 1997; Peñuelas et al., 1995).

Le PRI s'est avéré prometteur en permettant une estimation correcte de l'efficacité de la photosynthèse à l'échelle de la feuille pour de nombreuses espèces forestières (Garbulsky et al., 2011 ; Gamon et al. 1993) et agricoles (Strachan et al., 2002 ; Zhou & Wang, 2003 ; Ibaraki et al., 2010) et en permettant de suivre la baisse hivernale et la reprise d'activité printanière de la photosynthèse des espèces sempervirentes (Nichol et al., 2002 ; Stylinski et al., 2002 ; Fillela et al., 2009 ; Wong & Gamon, 2015).

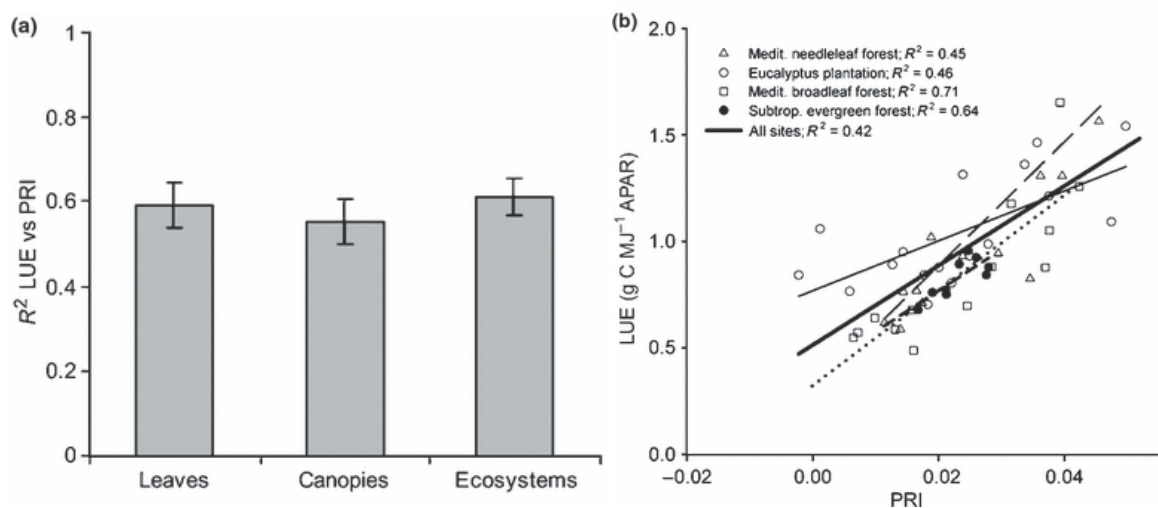


Fig. 13 : (a) Coefficient de détermination de la relation entre LUE (light use efficiency) et PRI (photochemical reflectance index) pour différentes échelles d'études. Les barres de dispersion représentent les erreurs standards ( $n=24$  études pour les feuilles,  $n=22$  études pour les canopées et  $n=7$  études pour les écosystèmes). (b) Exemples de relation entre LUE et PRI à l'échelle de l'écosystème sur une année pour différents types de forêts : une forêt de résineux méditerranéenne (triangle), une plantation d'Eucalyptus (cercle), une forêt de décidus méditerranéenne (carré) et une forêt sempervirente subtropicale (cercle noir) d'après Garbulsky et al. 2011.

Une relation linéaire entre PRI et LUE a été maintes fois observée à l'échelle de la feuille et du couvert (Gamon et al., 1990 ; 1992 ; Gamon & Surfus, 1999 ; Peñuelas et al., 1993 ; 1994 ; 1995 ; Filella et al., 1996, Trotter et al., 2002, Hall et al., 2008 ) (Fig.13).

Le PRI, par sa capacité à suivre l'efficacité de la plante à utiliser la lumière (LUE), semble permettre aussi de suivre l'état de stress des plantes en conditions de sécheresse. En effet il est corrélé au ratio de la fluorescence maximale variable ( $F_v/F_m$ , Weng et al., 2006), au rendement quantique de la fluorescence du PSII ( $\Delta F/F'_m$ ) ainsi qu'à la fluorescence liée au quenching non photochimique comme le montre Peñuelas et al. (1997). Cette dernière étude a été réalisée sur du chêne vert (*Quercus ilex*), du Filaire à large feuille (*Phillyrea latifolia*) et du Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus*) et a permis de mettre en évidence une corrélation entre le PRI et différents paramètres physiologiques des feuilles tels que le rendement de la fluorescence du PSII, le NPQ et la LUE. Le PRI comme proxy de l'activité photosynthétique est davantage controversé lorsque les plantes sont soumises à différentes contraintes climatiques.

Des résultats concernant le PRI en temps qu'indice du stress hydrique sont montrés dans Thenot et al., 2002 ; Peguero-Pina et al., 2008 ; Inoue et al., 2006 ; Sarlikioti et al., 2010 ; Inamullah et al., 2005. Peñuelas et al. (1997) et Inoue et al. (2006) mettent en évidence une limite de la réponse du PRI à la LUE en cas de stress sévère. Le flétrissement des feuilles suite à une trop forte sécheresse serait la cause de cette perte de relation entre le PRI et la régulation photosynthétique (Peñuelas et al., 1997 ; Stylinsky et al., 2002 ; Thenot et al., 2002). A l'inverse, Peguero-Pina et al. (2008) montrent que la relation se maintient, à l'échelle du couvert, même en cas de forte sécheresse sur le chêne kermès (*Quercus coccifera* L.), résultats connexes à Ripullone et al. (2011), qui ajoutent que cette relation est espèce-dépendante. Sarlikioti et al. (2010), approfondissent l'évaluation de la capacité du PRI à suivre l'état de stress hydrique des plantes en confirmant cette corrélation mais en ajoutant

qu'elle dépend du niveau du rayonnement incident auquel les feuilles sont soumises. Cela se confirme dans Winkel et al. (2002) qui ont recours aux mesures de PRI matinales afin d'obtenir une meilleure relation entre PRI et contenu en eau du sol. Weng et al. (2006) trouvent des corrélations entre PRI, niveau de fluorescence et températures des feuilles. Ces résultats sont en accord avec Guo et al. (2006) et Weng et al. (2008) mais ces derniers démontrent que la relation entre les paramètres étudiés (LUE,  $\Delta F/F_m'$ ) et le PRI est altérée avec la baisse de température en comparant des mesures prises avant l'aube à celles prises lorsque le soleil est au zénith.

Le PRI maintient aussi sa capacité à suivre le fonctionnement de l'activité photosynthétique en réponses aux variations liées ressources minérales du sol. En effet, l'étude de Shrestha et al. (2012) confirme le lien entre NPQ et PRI pour différents niveaux de fertilisation azotée. Quant à Zinnert et al. (2011) et Naumann et al. (2008), ils valident l'usage du PRI comme proxy des réponses physiologiques des feuilles liées à un stress salin. Enfin, les stress issus de contraintes au niveau atmosphérique ont aussi été étudiés, notamment avec Meroni et al. (2008) qui valident le PRI comme proxy de l'état physiologique des feuilles en conditions de stress oxydatif induit par des injections chroniques d'ozone.

Le PRI répond très rapidement aux changements du rayonnement incident parvenant au niveau de la feuille (Gamon et al., 1997 ; Hmimina et al., 2013 ; 2015, Annexe 2 ; Merlier et al. 2015). L'étude de Guo et al. (2004) montre que le PRI est fortement corrélé à la LUE pour un niveau de rayonnement incident constant, et qu'il est relié au niveau de saturation lumineuse de la feuille. Ces résultats sont rejoints par Busch et al. (2009), qui confirment cette propriété et montrent que le PRI est principalement modulé par l'intensité lumineuse incidente arrivant sur la feuille. Gamon & Bond (2013) ajoutent que cette relation dépendante de l'illumination incidente peut être modifiée par l'implication d'une variabilité liée à des

conditions d'exposition prolongées à l'obscurité. En conclusion, le PRI possède un grand potentiel en tant qu'indicateur de l'état physiologique des feuilles.

Cependant, à l'échelle de la canopée et à des échelles spatiales et temporelles plus larges, cette relation entre le PRI et la LUE se détériore (Gamon et al., 1992, Barton et al., 2001 ; Grace et al., 2007 ; Inoue et al., 2008). En fonction de la résolution temporelle ou spatiale utilisée, différentes sources de variabilité des propriétés du couvert végétal peuvent faire varier le signal PRI qui perd alors sa relation avec la LUE. Ces sources de variabilité peuvent être :

- Liées à la biochimie du couvert incluant d'autres pigments indépendants du fonctionnement photosynthétique du couvert

La variabilité saisonnière du PRI à l'échelle du couvert est fortement liée à la variabilité des pigments foliaires, en particulier concernant les contenus en chlorophylles et en caroténoïdes (Filella et al., 2009 ; Stylinski et al., 2002) voire au ratio caroténoïdes/chlorophylles (Sims & Gamon, 2002), particulièrement lors de la phase de débourrement et de sénescence des feuilles. La relation entre PRI et LUE reste forte à ces périodes mais cette relation traduit principalement la réponse du PRI à la dynamique temporelle des pigments foliaires pendant ces différentes phases phénologiques. Les variations directement liées à l'activité photosynthétique sont alors masquées. Ce lien fort entre le PRI et les caractéristiques biochimiques foliaires peut aussi gêner l'utilisation du PRI comme proxy de la LUE à l'échelle spatiale, comme le montre Ripullone et al. (2011). Au contraire, lorsque les caractéristiques biochimiques foliaires sont stables durant la période de temps considérée, le PRI permet de suivre la physiologie des plantes en évitant l'implication de facteurs confondants, comme le montre Naumann et al. (2008), Hmimina et al. (2013 et 2015, Annexe 2).

- Liées à la structure du couvert

Lors de la variabilité de la dynamique du couvert végétal, liée aux cycles saisonniers ou à des stress importants, la réponse du PRI est, comme pour tous les indices optiques, fortement impactée par les propriétés structurales du couvert, en particulier son indice foliaire, la distribution des tâches d'ombre et de lumière, les angles foliaires et le sol sous-jacent (Barton et North, 2001 ; Asner, 1998 ; Hilker et al., 2011). La relation PRI vs. LUE peut-être perdue et le PRI ne permet alors pas d'accéder aux propriétés physiologiques des plantes (Aparicio et al. 1999 ; Peñuelas et al., 1997 ; Soudani et al. 2014). Les effets de la distribution verticale des feuilles sont aussi importants comme montrés dans Gamon et al. (2012), Hmimina et al. (2015, Annexe 2) et Merlier et al. (2015) où les variations saisonnières du PRI ont été principalement expliquées par les propriétés biochimiques des feuilles de lumière.

- Liées aux conditions d'acquisitions, atmosphérique, de visée et d'angle solaire et les réponses spectrales du capteur (Castro-Esau et al., 2006 ; Harris et al., 2014).

En conclusion, suivant l'échelle de temps considérée et la résolution temporelle de la mesure, l'une ou l'autre de ces variabilités aura une implication différente dans le signal du PRI. De nombreuses études, cherchant à établir le lien entre le PRI et la LUE à l'échelle saisonnière, en moyennant les valeurs de PRI journalières, ou en ne considérant qu'une mesure de PRI par jour, n'ont permis que la mise en évidence de la composante du PRI corrélée aux variations du contenu en pigments foliaires car sa composante physiologique, renseignant sur le fonctionnement photosynthétique en réponses à des conditions abiotiques, est masquée par la dynamique des pigments. Nakaji et al. (2007) ont moyenné les valeurs de PRI acquises quotidiennement pendant 4 mois et ont montré que le PRI était davantage corrélé à la concentration en chlorophylle des plantes qu'à son efficacité à utiliser la lumière. Dans cette étude, la corrélation entre PRI et LUE variait entre saison et devenait même négative en automne pour le mélèze du Japon (*Larix kaempferi* Sarg). Les auteurs ont conclu sur la nécessité de combiner l'utilisation du PRI avec d'autres indices

biochimiques pour le déconvoluer des effets biochimiques et accéder à la valeur de la LUE à l'échelle de la saison.

La review de Garlbulsky et al. (2011) a montré que le PRI ne peut pas être utilisé en tant que proxy de la LUE sans séparation explicite de ces deux composantes ; celle liée aux propriétés biochimiques et structurales de la feuille ou du couvert et aux conditions de mesure, de celle liée à la gestion physiologique de la lumière absorbée. Les divergences entre études sur la capacité du PRI à suivre la LUE montrent la nécessité de mieux comprendre cet indice et la variabilité qui l'entoure. Gamon et al. (2012) ont introduit les termes de variabilité facultative et de variabilité constitutive afin de discerner d'une part la partie du PRI qui répond plus particulièrement aux changements rapides de pigments (changements réversibles à court terme des xanthophylles, liés à des variations physiologiques de la photosynthèse), et d'autre part la partie du PRI qui répond plus particulièrement aux changements lents de pigments (lié à des variations phénologiques - biochimiques et structurales - de la feuille ou du couvert).

Différentes voies de séparation entre ces deux composantes ont été proposées dans des travaux récents. Ripullone et al. (2011) ont mis en évidence de meilleures relations entre PRI et LUE lorsque la valeur du PRI est mesurée au moment où le soleil est au zénith est qu'elle est soustraite à la valeur mesurée aux moments où les angles solaires sont bas. Cheng et al. (2009) ont utilisé la différence entre les valeurs intra-journalières de PRI acquises sur des feuilles de lumière et celles acquises sur des feuilles d'ombre pour aboutir à une meilleure relation avec la LUE. Rahimzadeh-Bajgiran et al., (2012) ont proposé d'utiliser le « Calibrated PRI (CPRI) », issu d'une formule incorporant les effets d'autres pigments photosynthétiques. Garrity et al. (2010) ont proposé de corriger le PRI en utilisant le modèle PROSPECT-5 (Feret et al. 2008) afin de prédire le contenu en chlorophylle et le ratio caroténoïde/chlorophylle. Wu et al. (2010) ont modifié l'expression du PRI en ajoutant la

réflectance à 550 nm, afin d'incorporer le signal de la chlorophylle dans le PRI, ce qui augmente le lien entre leur PRI modifié et la LUE pour les feuilles ayant de faibles concentrations en chlorophylle. Wu et al. (2015) utilisent la forte relation entre PRI à l'échelle de la canopée et le LAI afin d'isoler la partie physiologique du PRI. Ils définissent la partie structurale du PRI comme fonction du LAI et utilisent les résidus de la relation PRI vs. LAI en tant que variabilité liée à la physiologie du couvert. Soudani et al. (2014) ont utilisé l'ordonnée à l'origine de la relation PRI vs. PAR pour estimer la composante constitutive. L'ordonnée à l'origine étant considérée comme étant un PRI en l'absence de lumière, elle est supposée ne refléter que la variabilité liée aux propriétés biochimiques et structurales du couvert puisqu'à lumière nulle, ou faible, le cycle des xanthophylles est inactif. La valeur du PRI de l'ordonnée à l'origine a été ensuite soustraite du PRI pour accéder à la variabilité physiologique du PRI.

Dans ce manuscrit, l'approche de déconvolution est basée sur la relation entre le PRI et le PAR afin d'isoler la variabilité du PRI liée à la LUE de la partie liée aux propriétés phénologiques, biochimiques et structurales, ne répondant pas aux variations lumineuses. L'intérêt de cette méthode a été mis en évidence dans Hmimina et al. (2013) à l'échelle de la feuille et dans Hmimina et al. (2015, Annexe 2) à l'échelle du couvert végétal. Dans ces deux dernières études, la relation PRI vs. PAR est résumée en trois paramètres distincts : le  $PRI_0$ , qui correspond à la valeur de PRI à une valeur de PAR très faible, voire nulle, estimée à partir de la valeur de l'ordonnée à l'origine ou directement mesurée à faible lumière sur une feuille adaptée à l'obscurité ; le  $PAR_{sat}$ , qui correspond à la valeur de PAR lorsque le PRI sature et ne répond plus à l'augmentation du PAR ; et le troisième paramètre, le  $\Delta PRI$ , qui correspond à l'amplitude de la variation du PRI entre le  $PRI_0$  et la valeur de PRI au  $PAR_{sat}$ .

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse se placent dans la continuité des travaux précédents de l'équipe et visent principalement à mieux comprendre les variations du PRI en



réponses aux contraintes abiotiques. L'objectif *in fine* est de valider l'approche de déconvolution décrite plus haut dans des conditions abiotiques contrastées aussi bien à l'échelle de la feuille qu'à l'échelle d'un couvert forestier adulte. Plusieurs expériences ont été menées. A l'échelle de six mini-couvertures de chêne, de hêtre et de pin sylvestre soumis à deux régimes hydriques contrastés, les effets des conditions physiologiques et phénologiques sur le signal PRI ont été investiguées sur un cycle phénologique complet, incluant le débourrement et la sénescence foliaire, et cela à haute résolution temporelle (à l'échelle de la minute/seconde pour les mesures spectrales). Cette haute résolution temporelle a aussi été appliquée à des acquisitions du PRI au dessus d'un couvert forestier adulte de chênes sessiles et pédonculés avec un sous étage de charmes (site de mesures de la tour à flux de Barbeau-Fontainebleau) afin d'étudier les relations PRI vs. PAR et de les exploiter pour étudier le fonctionnement carboné et hydrique de la forêt en conditions naturelles, soumise à une période de sécheresse.

A l'échelle de la feuille, des expérimentations en conditions contrôlées ont été entreprises afin d'étudier les relations PRI vs. PAR à l'échelle foliaire sur deux espèces, le chêne pédonculé et le chêne vert. Des jeunes plants ont été soumis à des conditions de stress hydrique et à l'ozone. Les relations PRI vs. PAR ont été établies en associant des mesures de PRI à des variations de rayonnement incident. Simultanément aux mesures spectrales, le fonctionnement physiologique de la plante a été décrit grâce à des mesures de fluorescence en lumière modulée et de la conductance stomatique. L'état biochimique a été caractérisé grâce à des mesures des contenus en chlorophylles et caroténoïdes.

En résumé, les objectifs sont :

- Comprendre les facteurs qui contrôlent la variabilité temporelle et spatiale du PRI à l'échelle de la feuille et du couvert.

- Caractériser les réponses du PRI à des variations abiotiques de l'environnement notamment en lien avec l'intensité de la lumière incidente et les facteurs de stress (teneur en eau du sol, déficit hydrique de l'atmosphère et la concentration en ozone de l'air).

- D'étudier ces propriétés afin de séparer, dans la variabilité du PRI, la composante constitutive, biochimique et structurale, de la partie physiologique liée au fonctionnement photosynthétique de la plante.

Comme souligné plus haut, trois approches ont été mises en œuvre pour répondre aux objectifs explicités ci-dessus. Ces approches seront décrites dans la partie suivante.

### **3. Approches et méthodes mises en œuvre**

#### **3.1. A l'échelle du couvert en conditions semi-contrôlées**

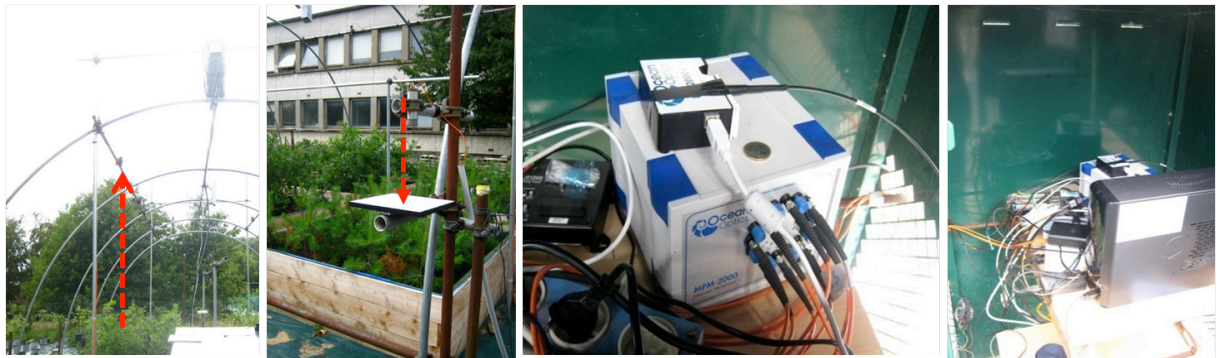
Le système expérimental est composé de trois espèces d'arbres de 4 ans incluant du chêne pédonculé (*Quercus robur L.*), du hêtre (*Fagus sylvatica L.*) et du pin sylvestre (*Pinus sylvestris L.*) à raison de 100 pieds chacun (Fig. 14). Les lots de chaque espèce sont séparés en deux et 50 pieds de chaque espèce sont répartis dans 1 des 6 bacs (2 x 2 x 0.5 m<sup>3</sup>) installés à l'extérieur du bâtiment Ecologie, Systématique, Evolution sur le site de l'Université Paris-Sud (Fig. 14). Les pieds ont été plantés en février 2011 à l'âge de 2 ans après avoir été sélectionnés afin d'avoir des tailles comparables.

Le sol de chaque bac est un mélange composé de 2/3 de compost et 1/3 de sable. Le fond des bacs est constitué d'une bâche perméable permettant à l'eau de s'infiltrer dans le sol sans être retenue dans les bacs. Deux drains ont été ajoutés au fond de la moitié des bacs pour subir un stress hydrique, un seul dans les bacs contrôles, cela afin de faciliter le drainage et d'introduire un contraste dans le contenu en eau du sol des deux types de traitements. Afin d'augmenter le contraste entre les plants témoins et « stress hydrique », les bacs avec les plants

stressés sont moins, ou ne sont pas, arrosés pendant la période estivale. Le but étant de ne pas introduire un stress trop important qui mènerait les plants à une sénescence prématurée et à une chute des feuilles, causant des changements majeurs dans la structure et les propriétés de la végétation.



*Fig. 14 : Le système expérimentale constitué de 3 espèces (chêne pédonculé, hêtre et pin sylvestre) chacune étant répartie dans 2 bacs distincts afin d'introduire un contraste de contenu en eau dans au sein de chaque espèce.*



*Fig. 15 : Le système expérimental composé de : une fibre optique située au dessus de chaque bac permettant de mesure la lumière réfléchiée par les bacs ; une fibre optique située au dessus d'une référence spectralon permettant de mesurer la lumière incidente ; un multiplexer à 16 entrées relié à un spectrophotomètre ; un ordinateur.*

Une structure en arche d'une hauteur de 5 m, est érigée au dessus des 6 bacs. Des fibres optiques sont centrées au dessus de chaque bac à environ 2 m au dessus de la canopée des arbres (Fig. 15). Une fibre optique, orientée vers le bas, mesure les propriétés spectrales réfléchies de chaque bac (ouverture numérique de 0.39 et d'un diamètre de 600  $\mu\text{m}$ , Thorlabs Inc., Newton, USA), une autre fibre est orientée à 7 cm au dessus d'une référence (Spectralon 99%, 25 x 25 cm, Labsphere, Inc., North Sutton, NH, USA) pour collecter les radiations incidentes. Toutes les fibres sont connectées à un multiplexeur (MPM2000, OceanOptics, IL, USA) composé de 16 entrées : 6 entrées pour les fibres de réflectance des bacs, 1 pour le spectralon et les dernières sont fermées par un connecteur et utilisées pour mesurer le bruit instrumental. Le multiplexeur est connecté à un spectromètre (LR1-T, 300-1000 nm, 0.66 nm resolution, ASEQ, LR1-T spectrometer, 300-1000 nm, 0.6 nm resolution, thermoelectric cooler (TEC) module, - 1 m 600  $\mu\text{m}$  core visible infrared (VIS-IR) fiber, Vancouver, Canada). Le système est calibré en radiance avec cette même configuration d'acquisition afin d'éviter les biais des mesures spectrales liés au design expérimental (venant principalement des différentes longueurs de fibres optiques et du multiplexeur). La calibration du système est réalisée au début de l'expérimentation et à la fin avec une lampe de calibration dont le spectre est connu (HL-2000 CAL, OceanOptics, IL, USA). Le système d'acquisition de mesures spectrales est automatisé en utilisant un programme MATLAB (Mathworks, Natick, MA, USA). Ce programme a été écrit de manière à permettre l'acquisition de mesures en continu à haute résolution temporelle (un spectre toutes les minutes suivant les conditions d'éclairement). Pour chaque acquisition spectrale, le temps d'intégration s'ajuste automatiquement afin de maximiser le ratio du signal spectral sur le bruit. L'acquisition des spectres s'effectue avec la séquence suivante : spectre de référence du spectralon, puis spectre de réflexion d'un bac, puis de nouveau un spectre de référence du spectralon. Cela permet de minimiser le bruit, lié aux variations des conditions d'éclairement du ciel, lors du calcul ultérieur de la réflectance. Le système d'acquisition a permis d'obtenir des spectres de la

phase de débourrement des feuilles jusqu'à la sénescence (de début avril 2013 à fin décembre 2013).

Un système d'acquisition des mesures de PAR et d'humidité du sol est installé. Au centre de chaque bac un quantum sensor est placé sous la canopée afin de mesurer le PAR transmis au sein du couvert. Un autre quantum sensor est placé au dessus des couverts et collecte les mesures de PAR incident. Les mesures sont enregistrées toutes les minutes sur toute la durée de l'expérience et permettront d'accéder à la fraction de PAR absorbé par le couvert (faPAR). Dans chaque bac, l'humidité du sol est mesurée automatiquement grâce à des thetaProbes (ML2x-UM-1.21, Delta-T Devices, UK) installées à 20 cm de profondeur. Les mesures d'humidité du sol sont enregistrées chaque heure sur toute la durée de l'expérience. En parallèle, des mesures manuelles de profil d'humidité du sol sont réalisées chaque semaine tous les 5cm de profondeur du sol pour chaque bac, à l'aide d'une sonde de profil d'humidité du sol PR2 (Delta-T Devices), et cela jusqu'à 70 cm. Chaque semaine, la structure de la canopée de chaque bac est analysée à l'aide d'un LAI 2000 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) au coucher du soleil afin que les capteurs mesurent les radiations incidentes en condition de lumière diffuse. Chaque bac est échantillonné de la même manière avec des mesures réalisées comme suit : au dessus du couvert, au dessous du couvert puis de nouveau au dessus du couvert. Ce schéma est répété 10 fois par bac à différents emplacements.

Au court de l'expérience, 10 feuilles d'ombres et 10 feuilles de lumières (prises respectivement sous le couvert et au point le plus haut) sont échantillonnées toutes les semaines dans chaque bac. Les feuilles sont immédiatement placées dans une enveloppe d'aluminium perforée et plongées dans l'azote liquide afin d'être préservées à -80°C pour la réalisation des dosages biochimiques.

Les données du LAI 2000 n'ont pas été utilisées dans l'analyse des résultats de cette expérience et la structure du couvert a été étudiée à l'aide des mesures de faPAR. Celles-ci

ont permis, dans notre cas, d'obtenir une meilleure approximation de la structure du couvert. En effet, les 50 plants de 4 ans situés dans les bacs représentent une densité importante de végétation entraînant des biais lors des mesures de LAI 2000, à la période de débourrement et de sénescence. Lorsque le couvert est ouvert, les valeurs mesurées sont anormalement élevées et très variables, lié à l'implication des rebords des bacs et à la proximité du capteur avec des branches ou troncs.

Les données d'humidité du sol obtenues avec le PR2 ont permis d'identifier la zone de variabilité du contenu en eau du sol des bacs et la zone de captage de l'eau par les racines. Cette zone se situe dans notre expérience à 20 cm de profondeur, correspondant à la zone échantillonnée par les thetaProbes toutes les demi-heures. Les valeurs d'humidité de sol utilisées lors de l'analyse des données de cette expérience sont celles issues des thetaProbes qui ont une résolution temporelle plus fine.

### **3.2. A l'échelle de la feuille en conditions contrôlées**

L'expérience est réalisée au centre de recherche en écologie expérimentale et prédictive, le CEREEP-Ecotron IleDeFrance, sur le site de Foljuif de l'Ecole Normale Supérieure (Seine et Marne). Le système Ecotron permet d'étudier la dynamique des écosystèmes sous des régimes climatiques divers et de différentes intensités. Le confinement du mésocosme couplé à l'application de conditions climatiques contrôlées permet d'induire des contraintes abiotiques et d'étudier les interactions entre les processus écologiques et physiologiques. Un Ecolab (Fig. 16) est composé de 3 cellules environnementales couplées à un bureau de contrôle permettant d'agir sur les différentes variables étudiées. Les 3 cellules (13 m<sup>3</sup> par cellule) fonctionnent de manière indépendante ce qui permet des études distinctes ou l'usage de répliques.



*Fig. 16 : Plateforme de l'écotron composée de plusieurs ecolab, chaque ecolab est composé de 3 cellules.*

La température, l'humidité, la lumière, l'eau et le contenu en gaz sont des variables indépendantes et sont contrôlées par ordinateur. Pour l'expérience, un pattern diurne de 24 heures est appliqué, comprenant 10 heures de lumière (POWERSTAR HQI-BT 400W/D PRO, OSRAM, Molsheim, France) et 14 heures d'obscurité. La température des trois cellules est maintenue à 25°C pendant la phase de jour et à 17°C pendant la phase de nuit. L'humidité relative reste constante à 60% dans les cellules qui ne subissent pas de variation de VPD. Concernant les gaz atmosphérique, le dioxyde de carbone est à une concentration de 350 ppm avec un contenu en dioxygène de 21%.

La première cellule est le contrôle de l'expérience, les paramètres y restent constants au cours de l'expérience. La seconde cellule constitue le traitement humidité, qu'on appellera « RH » et est paramétrée afin d'établir un gradient de déficit en vapeur d'eau (VPD) dans l'air allant de 80 à 30%, par pallier de 10%, au cours de la durée de l'expérience afin d'induire un déficit en eau par l'atmosphère. La troisième cellule « OZ » a été aménagée afin de permettre une injection d'ozone et de maintenir une concentration de 100 ppb pendant 4 heures par jour.

Un système d'injection d'ozone a été implémenté à une cellule Ecolab afin de réaliser cette expérience (Fig. 17). Ce système est composé d'un générateur d'ozone (Ozone

Generator C-Lasky series C-L010-DT, AirTree Ozone Technology Co, Baunatal, Allemagne) relié à une bonbonne de dioxygène. Un débitmètre massique permet de réguler la quantité de dioxygène amenée au générateur à l'aide d'une liaison RS 232 de contrôle commande en série avec l'ordinateur. Le générateur est relié à l'ordinateur par une liaison « Analog » permettant d'imposer une consigne pour la génération d'ozone. La concentration d'ozone de la cellule est suivie à l'aide d'un analyseur (Ozone Monitor Models 106-L, 2B Technology, Boulder, Colorado, USA) d'une résolution de 0.1 ppb. L'acquisition de la concentration en ozone s'effectue toutes les 10 secondes pendant toute la durée de l'expérimentation.

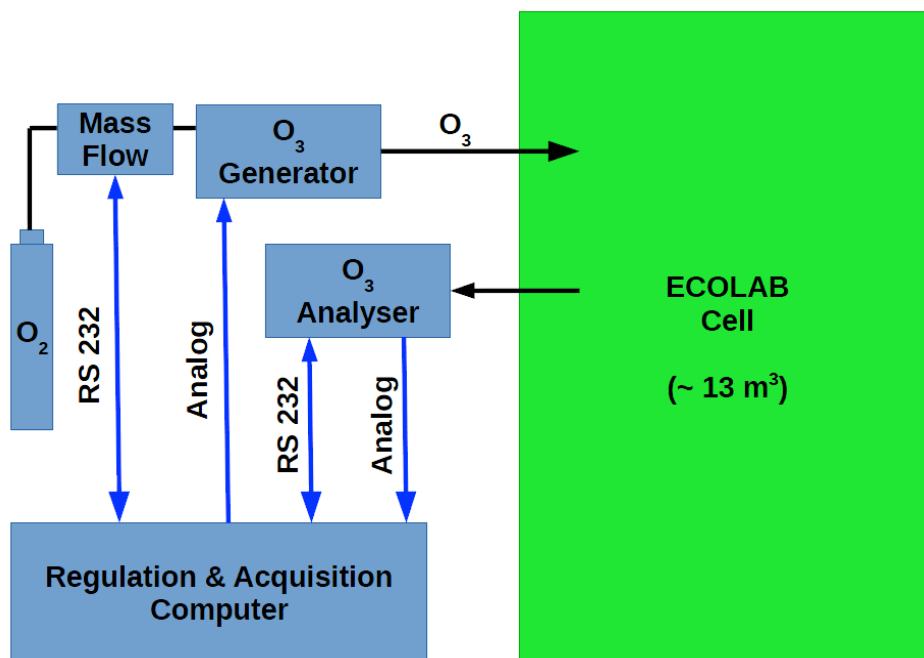


Fig. 17 : Schéma du système expérimental réalisé afin d'injecter de l'ozone dans une cellule de l'Ecolab.

De jeunes plants en pot de 2 ans de chêne (*Quercus robur L.*) et de chêne vert (*Quercus ilex*) sont séparés dans 3 cellules, à raison de 7 pots de chaque espèce dans chaque cellule de l'Ecolab, afin d'introduire différentes conditions environnementales, et acclimatés aux cellules 2 semaines avant le début de l'expérience. L'expérience dure 5 semaines afin de tester l'impact de stress chroniques sur les plantes et afin d'introduire un gradient de stress. Au cours de l'expérience et pour chaque cellule, des mesures de propriétés biochimiques,



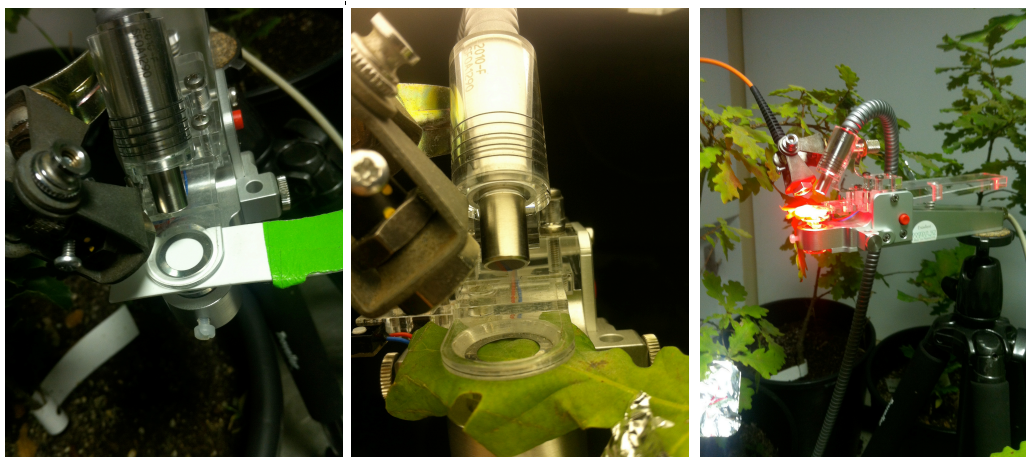
physiologiques et optiques ont été réalisées. Concernant les mesures biochimiques, le suivi de la concentration en chlorophylle, en xanthophylles et en flavonols a été effectué. La quantité de chlorophylle dans les feuilles est mesurée à l'aide d'un SPAD-502 (Konica-Minolta, Carrière-sur-Seine, France), d'un DUALEX® SCIENTIFIC (FORCE-A Dualex meter, Orsay, France), qui mesure également le contenu en flavonoïdes, et par des mesures spectrométriques au laboratoire. Les xanthophylles sont quantifiées par UPLC (Annexe 1). Les propriétés physiologiques sont mesurées grâce à la fluorescence chlorophyllienne à l'aide du PAM-2500 (pour pulse-amplitude-modulated, PAM2500, Walz, Effertlich, Germany) et par un poromètre pour mesurer la conductance stomatique des feuilles (Decagon devices, Inc, Pullman, Washington, USA). Une fibre optique, permettant de mesurer la réflectance des feuilles sur la même zone que la mesure de fluorescence chlorophyllienne, a été ajoutée à la pince PAM-2500. La fibre optique est connectée à un spectromètre (ASEQ, LR1-T spectrometer, 300-1000 nm, 50 nm resolution, TEC module, - 1m 600 $\mu$ m core VIS-IR fiber, Vancouver, Canada) permettant de réaliser en moyenne 7 spectres par seconde. Les mesures de propriétés optiques ont concernés les spectres de réflectance dans les bandes du PRI (Eq. 4) et du  $mNDI_{705}$  (Eq. 1).

Les feuilles échantillonnées sont au nombre de 10 par espèce et par jour. Les mesures biochimiques (chlorophylle, favonols) et physiologiques (conductance stomatique) réalisées à l'aide des appareils portatifs sont effectuées puis les feuilles sont enveloppées dans de l'aluminium et laissées 8 heures à l'obscurité. Le lendemain, les mesures sont réalisées sur ces mêmes feuilles afin d'étudier leurs caractéristiques en absence de lumière. A l'obscurité, après avoir enlevé la feuille d'aluminium, la fluorescence minimum ( $F_0$ ) est mesurée. Puis une faible lumière ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR sur la feuille) est appliquée à l'aide d'un panneau LED (LED PLC230V303-BN, CONRAD, 20W, 4000K) permettant de mesurer les spectres foliaires à très faible lumière. Enfin une mesure de référence est réalisée sur un spectralon 98% avec la même configuration que pour les mesures foliaires (Fig. 18).

Deux protocoles distincts sont réalisés. La moitié des feuilles échantillonnées sont instantanément plongées dans l'azote liquide et seront préservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , lyophilisées et broyées pour des mesures biochimiques ultérieures.

L'autre moitié des feuilles est utilisée pour étudier les réponses des feuilles aux variations de PAR concernant le PRI et la fluorescence chlorophyllienne. Une cinétique de 6 minutes avec des niveaux de PAR croissants puis décroissants est réalisée en lumière actinique rouge avec le PAM-2500 afin d'éviter les variations de réflectance issues de la lampe dans les longueurs d'onde utilisées pour le calcul du PRI. Les spectres sont acquis toutes les secondes et les mesures de fluorescence sont acquises toutes les minutes, sur la même zone de la feuille.

Après 2 semaines d'expérimentation, 3 pots de chaque espèce sont changés de cellule et mis dans les cellules comportant un autre traitement afin d'étudier l'impact de la succession de stress sur les propriétés des feuilles. Ainsi, 6 pots (de chaque espèce) de la cellule du traitement « HR » sont placés dans la cellule du traitement « OZ » et 6 pots de la cellule du traitement « OZ » sont placés dans la cellule « HR » (Fig. 19).



*Fig. 18: Design expérimentale : Un clip de feuille pour mesurer la fluorescence chlorophyllienne couplé à un système de mesure optique avec la même zone de mesure : Pour une mesure de référence (spectralon), une mesure de feuille et pendant la mesure d'une cinétique sur une feuille.*

DOY	203	204	205	210	211	212	217	218	219	224	225	226	231	232	233
Control		■			■			■			■			■	
RH	■		■	■		■			■			■			
OZ	■	■	■	■	■	■		■		■		■		■	
RH_OZ							■		■		■		■		■
OZ_RH							■			■			■		

Fig. 19 : Design temporel des traitements échantillonnés pour chaque cellule. RH concerne le traitement lié au stress hydrique atmosphérique, OZ concerne le traitement lié à l’ozone, RH\_OZ concerne le traitement avec les pots qui subissent un stress OZ après un stress RH et OZ\_RH concerne le traitement avec les pots qui subissent un stress RH après un stress OZ.

### 3.3. A l’échelle d’un couvert forestier mature en conditions naturelles

Le site expérimental est situé dans la forêt de Barbeau-Fontainebleau (48°28'35"N/2°46'48"E, code du site FLUXNET: FR-Fon; <http://www.barbeau.u-psud.fr/>, [www.fluxnet.ornl.gov](http://www.fluxnet.ornl.gov)) constitué de chêne sessile (*Quercus petraea* L.) et pédonculé (*Quercus robur* L.) dans l’étage dominants et un sous-étage dense de charmes (*Carpinus betulus* L.). Les arbres de la strate dominante sont âgés en moyenne de 150 ans et mesurent approximativement 25 m.

Les variables météorologiques et écosystémiques sont enregistrées notamment concernant les flux d’eaux et de carbone entre l’atmosphère et le couvert. Ces flux sont estimés grâce aux techniques d’eddy-covariance. Les données météorologiques acquises concernent les mesures couramment réalisées sur les sites de tour à flux et sont mesurées le long d’un profil vertical, depuis le sommet de la canopée (35 m) jusqu’au sol et du sol jusqu’à 1500 cm de profondeur. Ces mesures concernent la teneur en CO<sub>2</sub> atmosphérique, la vapeur d’eau, la vitesse du vent, les rayonnements incidents, réfléchis et transmis par la canopée, le déficit de pression de vapeur (vapour pressure deficit, VPD), les précipitations, la température de l’air, la concentration en ozone, les flux de sève et l’humidité du sol. Ces mesures sont enregistrées toutes les demi-heures.



Fig. 20 : Photo des installations situées sur la tour à flux de Barbeau.

La GPP est déterminée à partir des mesures de flux net de carbone et une estimation de la respiration de l'écosystème (sol et végétation). Elle est calculée comme suit (Delpierre et al. 2012).

$$GPP = NEE + ER$$

La partie du PAR absorbée,  $aPAR$  est calculée à partir de Soudani et al. (2014):

$$aPAR = iPAR - rPAR - tPAR$$

avec  $iPAR$  le PAR incident,  $rPAR$  le PAR réfléchi, mesurés au dessus de la canopée et  $tPAR$  le PAR transmis sous couvert à partir d'une série de 15 capteurs distribués au voisinage de la tour de mesure de flux dans un rayon de 30 m en raison de sa grande variabilité. Le  $tPAR$  est la moyenne des mesures obtenues par les 15 capteurs.

La LUE est calculée :

$$LUE = \frac{GPP}{aPAR}$$

Des mesures de PRI et de NDVI sont acquises en continu à un pas de temps de 30 min en utilisant deux capteurs optiques fixes situés au dessus de la canopée. Les capteurs intègrent des mesures depuis 2006 pour le PRI et depuis 2005 pour le NDVI (Soudani et al., 2014). Les mesures de PRI sont réalisées à l'aide de capteur SKR 1800 fabriqué par SkyeInstruments (Skyeinstruments Ltd., Llandrindod Wells, Royaume-Uni). Ces capteurs ont été utilisés et validés dans des travaux antérieurs (Soudani et al. 2014). Les mesures de NDVI sont acquises

avec des capteurs NDVI réalisées au sein du laboratoire ESE en suivant les méthodes données dans Pontauiller et al. (2003) et Soudani et al. (2012). Ces capteurs ont été utilisés et validés dans Soudani et al. (2012 ; 2014). En parallèle à ces mesures optiques issues de capteurs, des mesures spectrales en continu ont été réalisées depuis mai 2015 à l'aide de 2 spectromètres (LR1-T, 300-1000 nm, 0,66 résolution nm, instruments ASEQ, Vancouver, Canada). Le premier spectromètre est utilisé pour mesurer le rayonnement incident recueilli par un cosinus correcteur (CCSA1, Thorlab, Newton, NJ, USA) et le second permet de mesurer le rayonnement réfléchi par la canopée avec un angle de vue collimaté de 25°. Un mât portant les deux fibres est situé au sud de la tour. Les fibres sont situées à 7 m au dessus de la canopée et ont un champ de vision de 8 m<sup>2</sup> environ. La fibre mesurant le rayonnement réfléchi pointe à la verticale au dessus du couvert (au nadir). Les deux spectromètres sont synchronisés et le temps d'acquisition est ajusté automatiquement en fonction des conditions de lumière, ce qui résulte en l'obtention de spectres à une résolution temporelle qui varie entre 100 ms et 5 secondes. Toutes les mesures acquises issues du spectromètre ou des capteurs PRI et NDVI le sont sur la même zone de la canopée.

#### **4. Echantillonnages foliaires et dosages biochimiques réalisés**

Pour chacune des approches explicitées plus haut (mimi-couvert, feuille et forêt adulte), des échantillons de feuilles sont prélevés, puis rapidement placés dans des pochettes d'aluminium perforés (afin de les étiqueter et de les maintenir à l'obscurité), plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C pour les dosages. Chaque fois que les conditions expérimentales le permettent, des mesures de chlorophylle foliaire à l'aide des capteurs Dualex et SPAD ont été réalisées. Pour l'étape des dosages, les feuilles sont conservées et manipulées de manière à garantir l'intégrité de leur contenu en pigment (notamment en xanthophylles), elles sont conservées au froid à l'aide de bacs de glace et les manipulations s'effectuent à l'obscurité ou en lumière tamisée. Les feuilles sont ensuite lyophilisées pendant

48 h, pesées et photographiées afin de calculer leur LMA. Les différentes feuilles composant un échantillon sont alors mises en commun et broyées. Les broyats de feuilles en résultant sont maintenus à l'obscurité à -80°C et serviront pour les dosages biochimiques.

#### **4.1. Dosage de la chlorophylle**

Un sous-échantillon est réalisé afin de doser la quantité de chlorophylle dans les feuilles. Une quantité égale à 50 µg de broyat d'échantillon est extraite en ajoutant 10 ml de méthanol et maintenue en agitation pendant 90 min à 45°C dans un bain marie. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 5 min à 4000g d'après la méthode utilisée dans Cerovic et al. (2012). Le spectre d'absorption de chaque échantillon en solution est mesuré en utilisant un spectrophotomètre (ultraviolet visible (UV-VIS); HP 8453, Agilent, CA, US). Le contenu en chlorophylle (µg/cm<sup>2</sup>) est calculé en utilisant le coefficient d'extinction pour le méthanol pure donné dans Porra et al. (1989).

#### **4.2. Dosage des anthocyanes**

La quantité d'anthocyane contenu dans les feuilles est mesurée d'après Pirie & Mullins (1977). Une quantité de 50 µg de feuilles broyées est dissoute dans 10 ml de solvant d'extraction (composé de méthanol 50% avec 0.1% d'acide chloridrique) et maintenue en agitation 90 min à 45°C puis centrifugée 5 min à 4000g. Le spectre d'absorption de la solution est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (ultraviolet visible (UV-VIS); HP 8453, Agilent, CA, US). Le contenu total en anthocyanes est déterminé en soustrayant l'absorbance obtenue à la longueur d'onde 657 nm à l'absorbance à longueur d'onde 530 nm.

#### **4.3. Dosage des xanthophylles**

Les xanthophylles (violaxanthine, anthéroxanthine, zéaxanthine et lutéine) sont extraits d'après un protocole modifié basé sur Alegre & Munne (2000).

La séparation par UPLC est réalisée à l'aide d'une colonne ACQUITY UPLC HSS T3 column at 1.8  $\mu\text{m}$  and 2.1 x 100 mm (Waters, MS Technology, UK) en phase inverse. Ce protocole est basé sur Fu et al. (2012) et est adapté pour les espèces hêtre et chêne. Le protocole complet est disponible en Annexe 1. La méthode UPLC-UV est couplée à un système TOF (micrOTOF II, Bruker Daltonics, Wissembourg, France) avec l'interface d'ionisation de l'électrospray en mode positif. Les standards utilisés proviennent de DHI (LAB PRODUCTS, Hoersholm, Denmark) pour l'anthéroxanthine et la violaxanthine et de LGC Standards (LGC Standards SARL, Molsheim, France) pour la zeaxanthine et la lutéine.

En conclusion de ce qui précède, il ressort que les relations entre signaux optiques et fonctionnement carboné et hydrique des couverts végétaux, en particulier forestiers, sont de nature complexe et impliquent de nombreux facteurs et mécanismes biophysiques et physiologiques. Des approches en conditions contrôlées et naturelles, alliant les outils de l'écophysiologie végétale, la spectroscopie et la télédétection *in situ*, centrées sur la compréhension des mécanismes et l'objectif de hiérarchisation des facteurs les plus déterminants impliqués dans la variation des signaux optiques, en particulier du PRI, depuis l'échelle de la feuille à l'échelle du peuplement adulte sont nécessaires pour comprendre et mesurer la force du lien entre ces signaux et le fonctionnement carboné et hydrique de l'écosystème. Les prochains chapitres développeront ces approches et essayeront de répondre à ces objectifs.

## **CHAPITRE II**

**Explaining the variability of the photochemical  
reflectance index (PRI) at the canopy-scale:  
disentangling the effects of phenological and  
physiological changes**





# Explaining the variability of the photochemical reflectance index (PRI) at the canopy-scale: disentangling the effects of phenological and physiological changes

---

Elodie Merlier<sup>a</sup>, Gabriel Hmimina<sup>a</sup>, Eric Dufrêne<sup>b</sup>, Kamel Soudani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ. Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, F-91405. CNRS, Orsay, France.

<sup>b</sup> CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, F-91405, Orsay, France.

Corresponding author: [elodie.merlier@u-psud.fr](mailto:elodie.merlier@u-psud.fr)

DOI : 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.006

## 1. Abstract

Assessing photosynthesis rates at the ecosystem scale and over large regions is important for tracking the global carbon cycle and remote sensing has provided new and useful approaches for performing this assessment. The photochemical reflectance index (PRI) is a good estimator of short-term light-use efficiency (LUE) at the leaf scale; however, confounding factors appear at larger temporal and spatial scales. In this study, canopy-scale PRI variability was investigated for three species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L. and *Pinus sylvestris* L.) growing under contrasting soil moisture conditions. Throughout the growing season, no significant differences in chlorophyll content and in violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin were found between species or treatments. The daily PRI vs PAR (photosynthetically active radiation) relationships were determined using continuous measurements obtained at high frequency throughout the entire growing season, from early spring budburst to later autumn senescence, and were used to deconvolute the physiological PRI variability related to LUE variations due to phenological variability and related to temporal changes in the biochemical and structural canopy attributes. The PRI vs PAR relationship is used to show that the canopy-scale PRI measured at low radiation depends on the chlorophyll content of the canopy. The range of PRI variations at an intra-daily scale and the dynamics of the xanthophyll pool do not vary between days, which suggests that the PRI responds to a xanthophyll ratio. The PAR values at PRI saturation are mainly related to the canopy chlorophyll content during budburst and senescence and to the soil moisture content when the chlorophyll content is no longer a limiting factor. This parameter is significantly lower in the oak species that experience less stress from variations in soil moisture and is species dependant. These results provide new insights regarding the analysis and the meaning of PRI variability as a proxy for LUE at the canopy scale.

## 2. Introduction

Obtaining a better understanding of the photosynthetic responses of entire canopies to environmental factors over short periods is an important challenge for monitoring carbon exchange in forest ecosystems. Indeed, forest ecosystems play an important role in the global carbon cycle and its temporal variability because forest ecophysiological functioning is sensitive to the temporal variability of environmental factors and the multiple physical and biological processes involved. The FLUXNET network includes over five hundred coordinated eddy covariance flux tower sites that have continuously recorded measurements of carbon and water fluxes, meteorological factors and other ancillary soil and plant variables for more than fifteen years (Baldocchi et al. 2001). Nevertheless, the spatial representativeness of the FLUXNET network cannot account for the high degree of ecosystem diversity and the variability of abiotic factors that modulate ecosystem functioning. Remote sensing offers the opportunity to track vegetation structure, physiology and biodiversity at fine and coarse spatial and temporal scales. Spectral indices, such as the normalized difference vegetation index (NDVI) (Rouse et al., 1973), the enhanced difference vegetation index (EVI) (Huete et al., 2002) and the modified red-edge normalized difference index (mNDI<sub>705</sub>) (Sims and Gamon, 2002), which can track canopy physiological status, are associated with changes in canopy biochemical and structural attributes. However, when these attributes change, plant damage has already occurred. Abiotic stresses, such as the water-deficit stress, can affect the photosynthesis rate before symptoms of injuries appear on the leaf (rapid decrease of stomatal aperture resulting in decreasing photosynthesis and transpiration and increasing leaf temperature). Thus, it is important to monitor the physiological status of the canopy before symptoms of plant injury appear. The photochemical reflectance index (PRI) is linked to the xanthophyll cycle (Gamon et al. 1990) and can be used as a proxy for light use efficiency, as demonstrated in previous studies (Gamon et al., 1992; Peñuelas et al.,

1995; Stylinski et al., 2002). Indeed, stress factors limit photosynthetic activity and lead to an excess of absorbed energy that is dissipated by plants to avoid damage linked to increased leaf temperature. Fluorescence and other non-photochemical quenching (NPQ) mechanisms, including heat dissipation, (Björkman et al. 1995) are the primary methods of dissipation that allow for the re-emission of absorbed light energy at other wavelengths (Govindjee et al. 2004) and the exchange of excess energy from chlorophyll to xanthophyll cycle pigments. Under excess light, the pH of the photosynthetic membrane decreases, which activates the de-epoxidase enzyme. Therefore, violaxanthin (V) is converted to antheraxanthin (A) and then zeaxanthin (Z) by de-epoxidation. Zeaxanthin conversion involves a negative feedback control that allows heat dissipation via NPQ (Yamamoto. 2006). Most NPQ occurs through pH-dependent quenching (qE) and is correlated with the amount of zeaxanthin (Demmig-Adams et al. 1989). These reactions are reversed once the photosystem is no longer light saturated. The de-epoxidation state (A + Z) leads to variations in narrow light absorption bands between 505 nm and 535 nm and changes the reflectance at 531 nm (Gamon et al. 1992; 1997). Gamon et al. (1990) demonstrated that the PRI, the normalized difference between the reflectance measured at 531 nm and the reflectance at 570 nm, which is used as a reference band because it is not sensitive to variations in xanthophyll cycle pigments (Hmimina et al. 2013), can be used to predict light-use efficiency (LUE) and indirectly estimate photosynthesis efficiency under different stress conditions (Gamon and Surfus 1999; Sims and Gamon 2002; Ghulam et al., 2015; Hmimina et al., 2015).

Several other studies that were reviewed in Garbulsky et al. (2011) showed strong correlations between PRI and LUE at the leaf and canopy scales over a wide range of species, canopy structures and spatial scales. Nevertheless, the correlation strength between PRI and LUE decreases significantly at coarse spatial and temporal scales because the PRI signal is sensitive to the effects of confounding factors, such as the canopy biochemical (Moran et al. 2000, Stylinski et al. 2002; Nakaji et al. 2006; Filella et al. 2009;), structural (Hilker et al.

2008) and physiological properties (Dobrowski et al. 2005; Sarlikioti et al. 2010). The PRI is a composite signal that involves biochemical, structural and physiological factors and mechanisms which results in a non-univocal relationship between the PRI and LUE. Recent studies (Garrity et al. 2011; Hmimina et al. 2015) have focused on these confounding factors to correct for their effects and disentangle sources of PRI variability, including the differentiating factors related to physiological mechanisms and those related to canopy biochemical and structural properties.

The effects of biochemical attributes on the relationship between PRI and LUE were thoroughly analyzed in previous studies at the leaf (Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012; Hmimina et al. 2013) and canopy scales (Hmimina et al. 2015). A correction method for disentangling constitutive variability linked with chlorophyll content, i.e., unrelated to LUE, was proposed by Hmimina et al. (2013) at the leaf scale using  $PRI_0$ , which is the estimated PRI at low radiation and is highly correlated with the chlorophyll content. When  $PRI_0$  is subtracted from PRI, a unique relationship between the corrected PRI and LUE is obtained that is less sensitive to chlorophyll content. Hmimina et al. (2015) used the same approach at the canopy scale during the summer growing season (period of leaf area index (LAI) plateau for deciduous plants). When the canopy  $PRI_0$ , which is strongly related to the canopy chlorophyll content, is subtracted from the canopy PRI, a robust generic PRI vs. LUE linear relationship is generated at the canopy scale. However, the scope of these results is limited to the period of LAI stability, and the effects of variations in canopy structural and leaf biochemical attributes related to phenology have not been investigated. In addition, Hmimina et al. (2015) did not perform a thorough investigation of the effects of soil water conditions on canopy PRI vs. LUE at the canopy scale, and the effects of soil water content on the PRI are not well understood. Studies have shown that the PRI responds to water stress conditions (Sarlikioti et al. 2010; Isoda A. 2005; Suárez et al. 2008; Inoue & Peñuelas. 2015); however, these studies were mainly conducted over crops under controlled conditions or under a limited

range of environmental conditions. Moreover, these studies highlight different results, with PRI responding to water content in specific cases. In Isoda et al. (2005), the relationships between PRI and water content do not appear in all species, and Sarlikioti et al. (2010) showed that this relationship only appears at high levels of light intensity.

In conclusion, the effects of canopy phenology, biochemical temporal dynamics and physiological responses to soil moisture at the canopy scale on the variability of PRI at high temporal resolutions require further investigation.

In this study, saplings of the three main tree species in temperate forests (oak, beech and Scots pine) were subjected to contrasting soil moisture conditions, and continuous PRI measurements and canopy attributes were acquired over one year at a temporal resolution of several minutes and throughout the growing season, from budburst in early spring to the end of senescence in late autumn. The effects of temporal changes of canopy characteristics and soil moisture contents on PRI were investigated, and an approach for differentiating among the effects of these confounding factors on PRI variability at the canopy scale was proposed.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Plant materials**

In this study, 100 four-year-old oak (*Quercus robur* L.), 100 four-year-old beech (*Fagus sylvatica* L.) and 100 four-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) saplings are separated into six outdoor planter boxes of 2 x 2 x 0.5 m<sup>3</sup>, with 50 trees planted in each plot (Fig. 1a). The soil in the planter boxes is a mixture composed of 2/3 compost and 1/3 sand with a permeable bottom. Saplings from each species are randomly distributed into two planter boxes that are submitted to two contrasting soil moisture conditions. Hereafter, the drier plots are referred to as “treatment” and the remaining plots are referred to as “control.” To induce different soil water statuses, drains are installed under the planter boxes. In the treatment plots, two drains

are installed, and in the control plots, only one drain is installed. To avoid severe drought, irrigation is applied during long dry periods in all plots, with less irrigation applied to the treatment plots. The objective of this irrigation is to promote different water statuses for the same species without causing a strong drought that may result in major changes in the canopy structure and leaf biochemical properties.

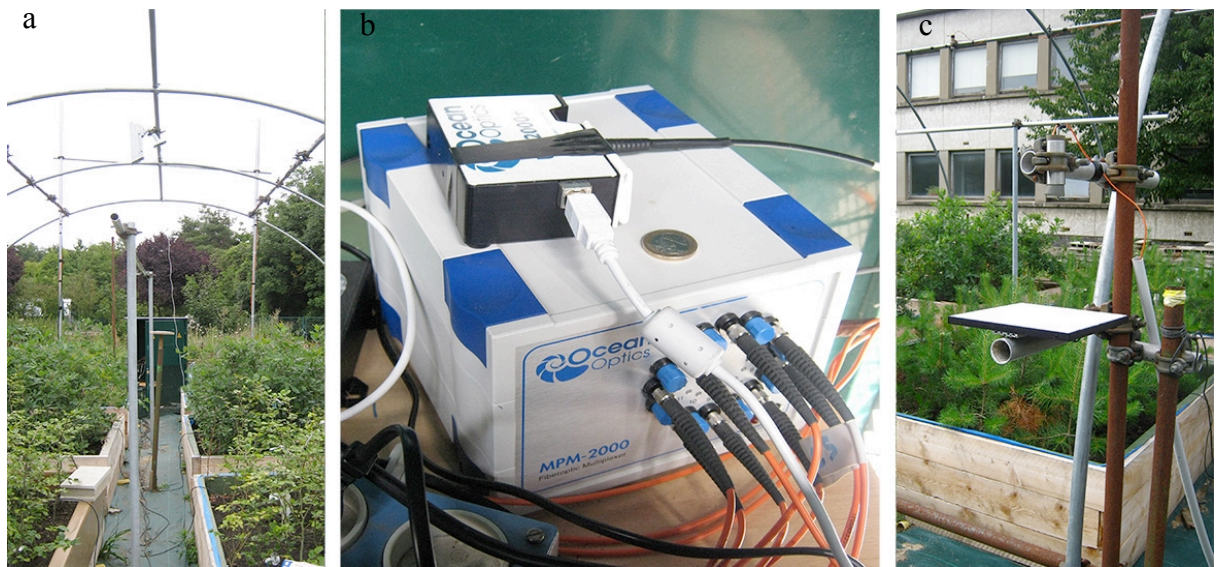
## **3.2. Measurements**

### **3.2.1. Canopy scale measurements**

A steel pipe greenhouse structure with a height of 5 m is erected above the six planter boxes, and above each planter box an optical fiber (numerical aperture 0.39, core diameter 200  $\mu\text{m}$ , FOV 45.9°, Thorlabs, Newton, NJ, USA) that points downward towards its center is installed to collect reflected radiation (Fig. 1a). Another optical fiber is installed above a Spectralon reference panel (Spectralon 99%, 25 x 25 cm, Labsphere, Inc., North Sutton, NH, USA) to collect incident radiation (Fig. 1c). All of the optical fibers are connected to a 16 input port optical multiplexer (MPM2000, OceanOptics, IL, USA, Fig. 1b). The multiplexer allows to connect alternatively and automatically the spectrometer to one of 16 channels. Six channels are used to measure the spectrum of reflected light over the 6 planter boxes, and one channel is used to measure the incident light reflected on the reference Spectralon panel. The remaining unconnected input ports are used to measure the spectrometer dark noise. The output port of the multiplexer is connected to a spectrometer (ASEQ, LR1-T spectrometer, 300-1000 nm, 0.6 nm resolution, thermoelectric cooler (TEC) module, - 1 m 600  $\mu\text{m}$  core visible infrared (VIS-IR) fiber, Vancouver, Canada). To prevent discrepancies between spectral measurements that are caused by experimental design (mainly from the multiplexer and differences in optical fiber length), the measurements are calibrated in radiance in the field in the same acquisition configuration using a calibration lamp (HL-2000 CAL, OceanOptics, IL, USA) at the beginning and end of the experiment. This acquisition system



of spectral data is automatized using a MATLAB (Mathworks, Natick, MA, USA) program to allow for continuous measurements at a high temporal resolution. For each spectral acquisition, the integration time is adjusted to maximize the spectrum signal versus noise ratio, and one spectrum is saved approximately each minute in the sequence reference panel > above canopy > reference panel to minimize the reflectance noise that potentially results from changes in sky conditions.



*Fig. 1: The experimental design: (a) – the steel pipe greenhouse with the optic fiber above each planter box (6 planter boxes composed of three species (oak, beech, and scots pine) under two water conditions); (b) – the optical multiplexer with 16 input ports (6 for above canopy optical measurements, 1 for the reference spectralon panel and the remaining inputs for dark noise measurement); and (c) – optical fiber above the reference spectralon panel.*

In the center of each planter box, a quantum sensor is placed under the canopy cover to assess the transmitted photosynthetically active radiation (PAR), and another sensor is placed above the canopy to collect the incident PAR measurements. The PAR measurements are recorded every minute. In each planter box, soil moisture is measured automatically using a thetaProbe (ML2x-UM-1.21, Delta-T Devices, UK) installed at a depth of 20 cm. Measurements are recorded every hour, and manual soil moisture profile measurements are

performed in each plant box every week at all soil depths using a PR2 soil moisture profile probe (Delta-T Devices).

### **3.2.2. Leaf pigment measurements**

Throughout the experiment, 10 sunlit and 10 shaded leaves are sampled weekly in each planter box. Leaves are immediately packed in aluminum paper, frozen in liquid nitrogen and preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Next, the leaves are lyophilized, weighed and scanned one by one to obtain their areas. Then, the samples are crushed, and the resulting powder is divided into two sub-samples and maintained in the dark at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The first leaf powder sub-sample is used to quantify the chlorophyll (and carotenoid) pigments.

Leaf chlorophyll content measurements are used to validate the relationship with canopy-scale  $\text{mNDI}_{705}$ , which is used as a proxy of temporal changes in chlorophyll content at the level of the entire canopy throughout the experiment. Next,  $15\ \mu\text{g}$  of leaves are extracted using 10 ml of methanol and stirred for 90 minutes at  $45^{\circ}\text{C}$ . Then, the samples are centrifuged for 5 minutes at 4000 g based on the method described in Cerovic et al. (2012). The absorption spectrum of the sample solution is measured using a spectrophotometer (ultraviolet visible (UV-VIS); HP 8453, Agilent, CA, US). The absolute amount of chlorophyll ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) is calculated using the extinction coefficients for pure methanol given in Porra et al. (1989).

The second leaf powder sub-sample is used to quantify the xanthophyll pigments (violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin and lutein). The extraction protocol is based on Alegre & Munne (2000). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-UV separation is performed using an ACQUITY UPLC HSS T3 column at  $1.8\ \mu\text{m}$  and  $2.1 \times 100\ \text{mm}$  (Waters, MS Technology, UK) in reverse phase. This protocol is based on Fu et al. (2012) and adapted for oak and beech leaves. UPLC-UV is coupled in line with a time-of-flight system (micrOTOF II, Bruker Daltonics, Wissembourg, France) using the positive mode of the

electrospray ionization interface. Standards are purchased from DHI (Denmark) for antheraxanthin and violaxanthin and from LGC Standards (France) for zeaxanthin and lutein.

### 3.3. Data analysis

Spectral measurements are acquired at the canopy scale above the planter boxes, above the reference Spectralon panel and from input ports of the multiplexer used to assess dark noise. The dark noise measurements are subtracted from each spectrum, and the resulting spectra are smoothed using a robust loess local regression (Cleveland WS, 1979) before using them to calculate reflectance based on the closest time spectrum of the Spectralon reference. All of the spectral measurements (approximately 28524 reflectance spectra) are processed using MATLAB (Mathworks). Reflectance measurements are used to derive the  $mNDI_{705}$  and PRI spectral indices. Two spectral indices are used to describe the temporal changes in the canopy structural, biochemical and physiological properties.

The PRI is used as a proxy to assess canopy light use efficiency (LUE):

$$PRI = \frac{(R_{531} - R_{570})}{(R_{531} + R_{570})} \quad (\text{Eq.1})$$

The  $mNDI_{705}$  is used as a proxy to track temporal changes of the canopy chlorophyll content.

$$mNDI_{705} = \frac{(R_{750} - R_{705})}{(R_{750} + R_{705} - 2 * R_{445})} \quad (\text{Eq.2})$$

where  $R_{445}$ ,  $R_{531}$ ,  $R_{570}$ ,  $R_{705}$ , and  $R_{750}$  are the reflectances integrated over a 5 nm waveband centered at 445 nm, 531 nm, 570 nm, 705 nm and 750 nm, respectively.

Factors explaining the variations of PRI at the canopy scale are assessed at intra-daily and seasonal scales. At the intra-daily scale, PRI responds to PAR variations, and these responses

are analyzed using a non-linear regression based on the following expression given in Hmimina et al. 2015:

$$PRI(t) = PRI_{0,j} + \Delta PRI_j * erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat,j}}\right) \quad (\text{Eq.3})$$

$$\text{with } erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat,j}}\right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{PAR(t)/PAR_{sat,j}} exp^{-x^2} dx$$

where  $PRI_0$ ,  $PAR_{sat}$  and  $\Delta PRI$  are three parameters estimated using mean square minimization and erf is the error function (also called the Gauss error function). The assumptions used to select this expression are explained below.

The first parameter,  $PRI_0$ , is defined as the intercept of the relationship between the PRI and incident PAR at leaf scale according to Hmimina et al. (2013). Hmimina et al. (2013) showed a strong linear relationship between this parameter and the leaf chlorophyll content. An identical approach is used in this study at the canopy scale.  $PRI_0$  is determined at the canopy scale to express the link between PRI and canopy structural and biochemical properties.

The erf function is used because it is a Gaussian continuous integral between 0 and x and varies between 0 and 1 ( $x \geq 0$ ). Furthermore, the PRI response to PAR is expected to be cumulative and varies following the cumulative Gaussian curve because of its association with xanthophyll de-epoxidation regulation (Takizawa et al. 2007).

$PAR_{sat}$  corresponds to the PAR value when the PRI to PAR response shows saturation (lack of PRI response to increasing PAR, Hmimina et al, 2013). This parameter is defined by its similarity to the light saturation asymptote in the photosynthesis light response curve. Thus, under our experimental conditions,  $PAR_{sat}$  is expected to be sensitive to the leaf

chlorophyll content or soil water conditions because they strongly limit the maximum photosynthetic capacity.

The  $\Delta$ PRI expresses the range of canopy PRI variations at the intra-daily scale. Thus,  $\Delta$ PRI reflects the temporal dynamics of PRI at the daily scale in response to light conditions. As discussed in the introduction, PRI is sensitive to the xanthophyll cycle over short time scales; therefore, we assume that  $\Delta$ PRI may reflect the temporal concentration variations of different pigments involved in this cycle.

Statistical analyses are conducted using the R software. Wilcoxon-Mann-Whitney U tests (WMW tests) are used to examine differences between species and treatments, and linear and multi-linear regression analyses are used to examine the relationships between variables.

At the seasonal scale, the variability of the PRI response to PAR between days ( $PRI_0$ ,  $PAR_{sat}$  and  $\Delta$ PRI; described by Eq.3) is further examined to assess its relationships with the seasonal variability of the soil moisture content and canopy biochemical properties. The total variance of each parameter (variance throughout the growing season) is decomposed into the individual variances of the explanatory variables (mNDI<sub>705</sub> as a proxy of the entire canopy chlorophyll content and soil moisture content) to determine the relative importance of each variable that contributes to the total amount of PRI variability throughout the growing season. This decomposition is achieved using a moving window of 15 days starting at budburst and ending at the end of the senescence phase. The size of the moving window includes the number of observations needed to achieve a sufficient statistical power and the length of the time window, which should be short enough that it does not include any significant changes in the soil moisture content or canopy biochemical attributes. These analyses are performed using the R package relaimpo (relative importance of regressors in linear models; see Grömping (2006) for more details).

## **4. Results**

### **4.1. Temporal variability of canopy structure and physiology**

The temporal dynamics of the soil moisture content are shown in Fig. 2a and indicate the temporal variations caused by precipitation and irrigation. The synchronous peaks of soil moisture content were observed in each plot and correspond to precipitation events, whereas asynchronous peaks between plots correspond to different irrigation intensities.

In the pine plots, the soil water content was low in the treatment plot relative to the higher values in the control plot. In the oak plots, the soil moisture content was low and reached a minimum on day 250 (day of year, DOY) until the end of the growing season, which potentially contributed to the earlier senescence of the oak treatment plot relative to the oak control plot (Fig. 2b). In the beech plots, the soil moisture content was the weakest and significant differences between the control and treatment plots temporarily appeared over short periods (several days) and were interrupted by irrigation events.

Seasonal variations of the fraction of absorbed PAR (faPAR; Fig. 2b) reproduced the temporal dynamics of the canopy structure of the three species. The temporal patterns of oak and beech are related to their leaf phenology, which is characterized by the following stages: a non-leafy season during the winter and autumn and a leafy season beginning in mid-spring and ending in late summer. The temporal dynamics of the canopy structure showed that the canopy leaf area following leaf budburst increased to a plateau at DOY 140 and then decreased after DOY 300 because of leaf senescence. Leaf senescence began earlier for oak than for beech and first appeared in the treatment plots. In the oak plots, the faPAR remained higher in the control plot, and the contrast was more important towards the end of the season. In the beech plots, dead leaves from the previous year (2011) were retained on branches in the winter and autumn (the marcescence) until DOY 120 when new leaves replaced the old. The

pine plots showed slight variability of faPAR during the year because of their phenology, which is characterized by small canopy cover variations, and its high LAI.

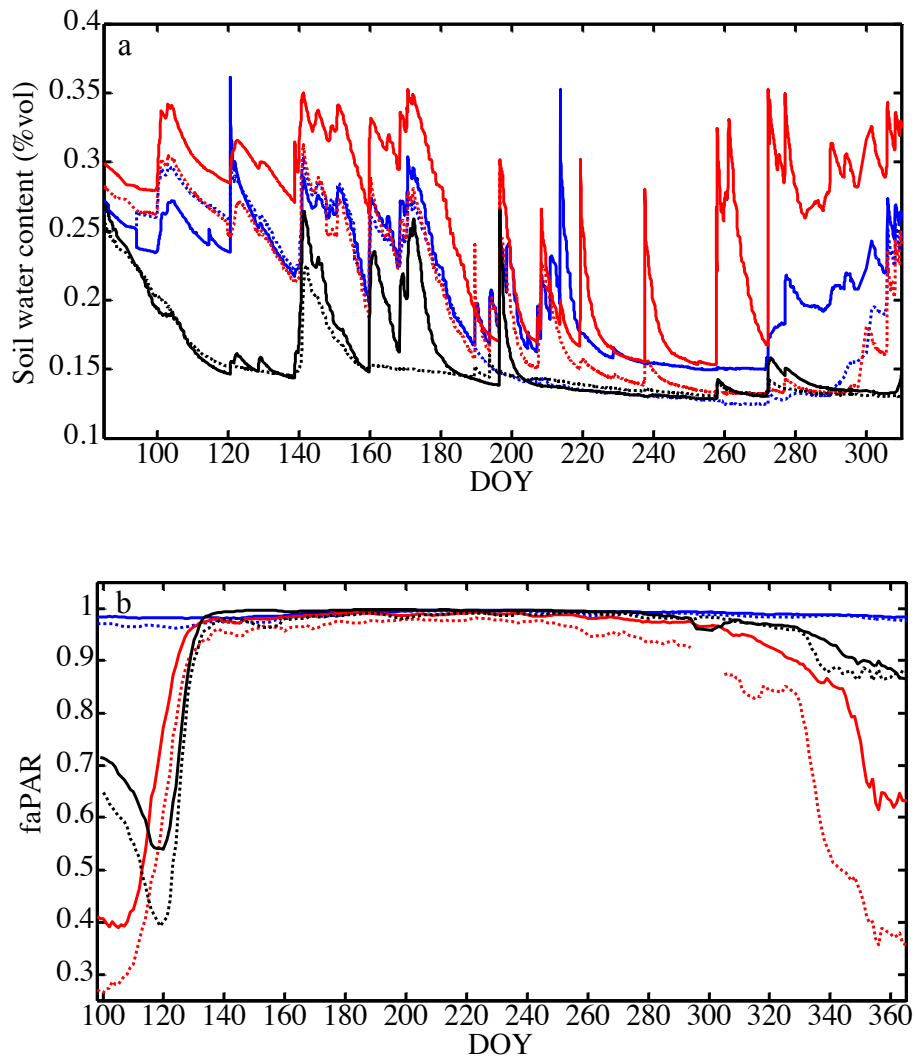


Fig. 2: (a). Dynamics of soil water content measured at a depth of 30 cm for each of the 6 planter boxes. (b). Temporal dynamics of the canopy structure based on the fraction of absorbed photosynthetically active radiation (faPAR) for each of the 6 planter boxes. Blue denotes the pine plots; red denotes the oak plots; black denotes the beech plots; solid lines denote the control plots; and thin dotted lines denote the treatment plots.

As detailed in the Materials and Methods (2.3),  $mNDI_{705}$  is used to describe temporal changes in the chlorophyll content at the canopy scale, and these changes are related to seasonal variations in the LAI and leaf chlorophyll content. The calibration relationships

between canopy-scale  $mNDI_{705}$  and measurements of leaf-scale chlorophyll content are shown in Fig. 3.

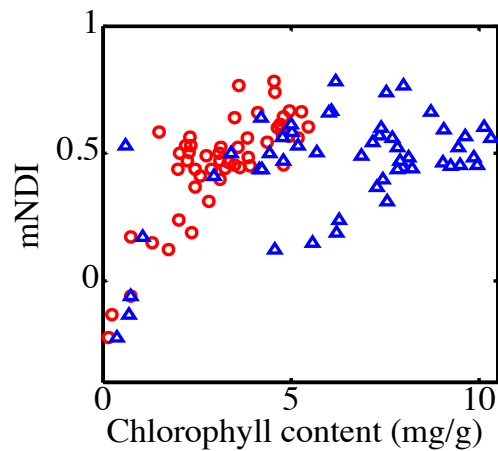


Fig. 3: Relationship between canopy  $mNDI_{705}$  and measured leaf chlorophyll content (mg/g) for pooled oak and beech species. (Red circles indicate sunlit leaves and blue triangles indicate shaded leaves).

The relationship between the  $mNDI_{705}$  and leaf chlorophyll content varied depending on whether all of the leaves were considered or whether the species and stratum were considered separately. In deciduous species, when sunlit and shaded leaves (all leaves pooled) were considered, the relationship between  $mNDI_{705}$  and leaf chlorophyll was statistically significant ( $R^2=0.29$ ,  $p<0.001$ , df 93), with an RMSE of 2.22 mg/g. The relationship between the two variables strongly improved when sunlit and shaded leaves were considered separately. For shaded leaves, the  $R^2$  value was 0.34 ( $p<0.001$ , df 49) and the RMSE was 2.09 mg/g. For sunlit leaves, a significant relationship was observed between the leaf chlorophyll content and faPAR at the canopy scale ( $R^2=0.37$ ,  $p<0.001$ , df 49). For sunlit leaves, the  $R^2$  value between the  $mNDI_{705}$  and chlorophyll content was 0.79 ( $p<0.001$ , df 42) and the RMSE was 0.62 mg/g. For sunlit leaves, no significant relationship was observed between the leaf chlorophyll content and faPAR. These results for sunlit leaves reflect the high sensitivity of the reflectance-based index  $mNDI_{705}$  to the biochemical properties of the leaves (chlorophyll content) in the upper canopy layers.



However, in pine plots, the variability of the chlorophyll content is weak, and no correlation between  $mNDI_{705}$  and leaf chlorophyll was observed (data not shown), which can be explained by the inability to distinguish between sunlit and shaded needles within the crown during field sampling because needle aggregation in shoots does not allow for easily identifiable foliage stratification and needle age classes are not differentiated.

During the growing season,  $mNDI_{705}$  exhibited different temporal patterns between the deciduous and pine trees (Fig. 4). These temporal patterns of  $mNDI_{705}$  reflect the temporal changes in the chlorophyll concentration at the leaf scale and the dynamics of the total leaf area index at the canopy scale. Throughout the growing season, a 95% tolerance interval was superimposed, and significant differences were not observed between treatments.

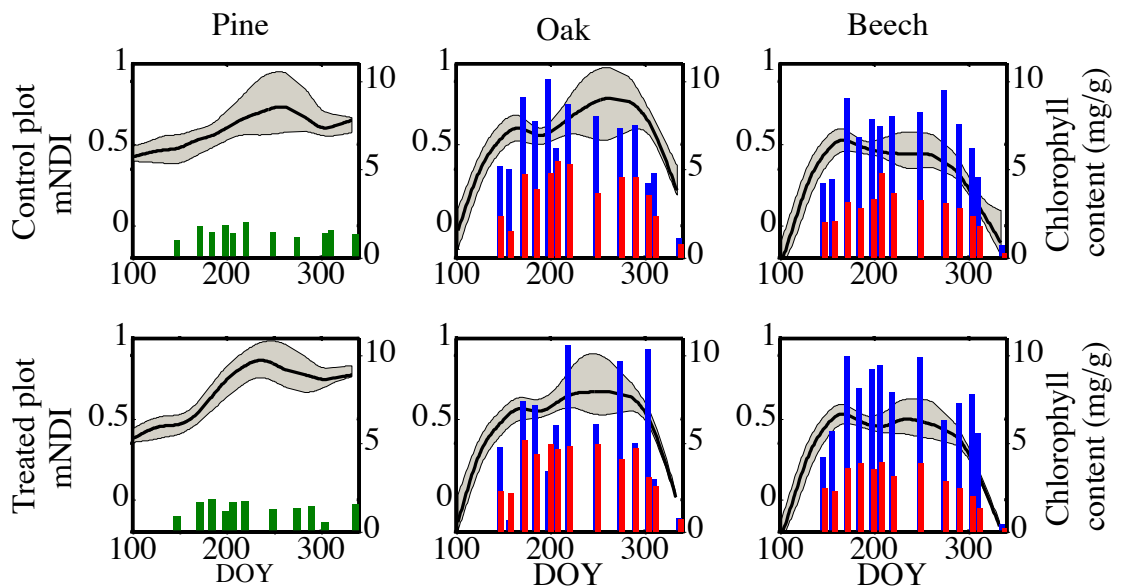


Fig. 4: Dynamics of canopy  $mNDI_{705}$  and leaf chlorophyll content in mg/g. (Histograms of chlorophyll content: blue indicates shaded leaves; red indicates sunlit leaves; green indicates needles; black lines indicate the moving median  $mNDI_{705}$ ; and shaded areas indicate the 95% tolerance intervals).

Compared with deciduous species, the  $mNDI_{705}$  measured over pine plots showed low variability for both control and treatment plots. However, a seasonal dynamic is highlighted

that is characterized by an increase in  $mNDI_{705}$  during the spring until DOY 260 in the control plot and DOY 240 in the treatment plot.

For the deciduous oak and beech species, the temporal patterns of  $mNDI_{705}$  are similar. The  $mNDI_{705}$  increases rapidly in the spring and reaches its peak during the first half of June at approximately DOY 170, which is approximately 30 days after the faPAR plateau. Nevertheless, the  $mNDI_{705}$  decreases in both species over a short period in late June. During the senescence phase in the autumn, the  $mNDI_{705}$  decreases rapidly.

The temporal patterns of xanthophyll pigments are provided in Fig. 5a for the entire growing season and indicated that the pool of violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin (VAZ) decreased for the deciduous species in both shaded and sunlit leaves throughout the growing season ( $R^2=0.31$   $p<0.002$  for shaded leaves and  $R^2=0.235$   $p<0.009$  for sunlit leaves). This decrease also occurred for beech species. Fig. 5b shows that the violaxanthin pool that was not converted to zeaxanthin was correlated with the chlorophyll content ( $R^2=0.61$   $p<0.001$ ). Fig. 5c shows that the xanthophyll pools, including violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin and lutein, are correlated with chlorophyll content for the entire dataset ( $R^2=0.59$   $p<0.001$ ). However, a correlation was not observed between the  $\Delta PRI$  and xanthophyll contents (data not shown).

No difference was observed in the violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin contents between the two deciduous species or between the control and treatment plots for oak and beech when using the Wilcoxon-Mann-Whitney U test. Although the VAZ content was not significant at 5%, a lower value was observed for shaded leaves than for sunlit leaves, as shown in Table 1.

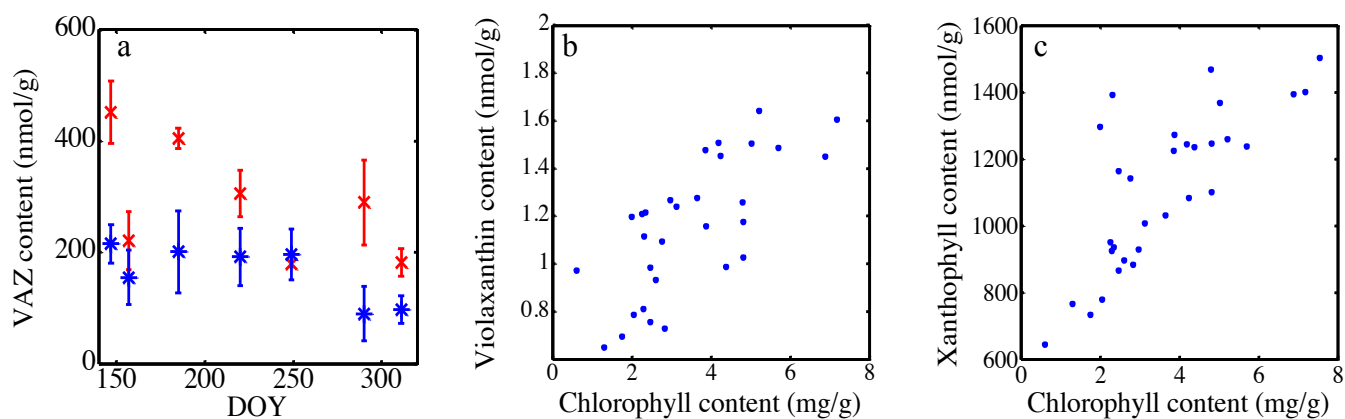


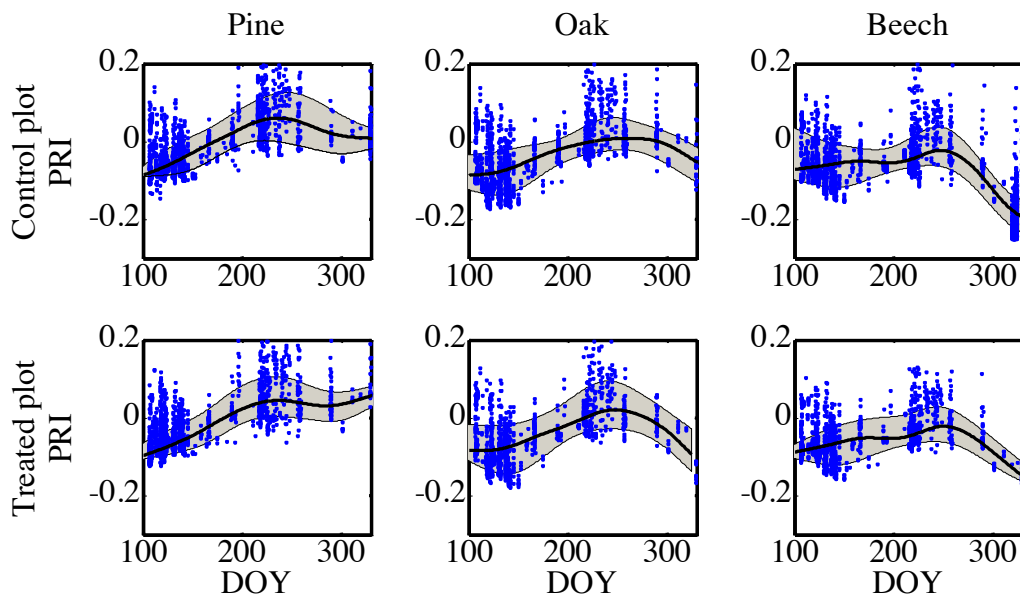
Fig. 5: (a). Dynamics of canopy xanthophyll pigment (violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin in nmol/g dry matter; blue indicates shaded leaves and red indicates sunlit leaves; mean and standard error of mean). (b). Relationship between the chlorophyll content (mg/g) and violaxanthin content (nmol/g dry matter). (c). Relationship between the chlorophyll content (mg/g) and xanthophyll content, including violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin and lutein (nmol/g dry matter).

Species	Position	Violaxanthin	Antheraxanthin	Zeaxanthin	Lutein	Chlorophyll
Oak	Sun (n=7)	1.11 (0.34) 0.87 - 3.46	0.87 (0.67) 0 - 4.9	266.56 (58.9) 113.2 - 508.9	808.34 (167.44) 253.87 - 1514.28	3.36 (0.51) 1.5 - 5.28
	Shade (n=7)	1.64 (0.37) 1.06 - 3.34	0.6 (0.3) 0 - 2.23	116.54 (37.25) 4.63 - 294.7	925.91 (153.28) 486.08 - 1495.11	6.71 (0.62) 4.79 - 8.73
Beech	Sun (n=14)	0.89 (0.06) 0.65 - 1.28	1.25 (0.36) 0.17 - 4.58	317.38 (34.9) 164.5 - 572.58	633.9 (24.74) 482.59 - 836.83	2.69 (0.21) 1.3 - 3.87
	Shade (n=14)	1.94 (0.35) 0.87 - 5.9	1.24 (0.33) 0.1 - 4.9	182.7 (27.31) 34.64 - 373.82	755.3 (46.79) 447.28 - 1018.72	6.61 (0.49) 4.17 - 9.87

Table 1: Summary statistics of the xanthophyll content (nmol/g dry matter) and chlorophyll content (mg/g dry matter) of oak and beech species (mean (standard error), min – max).

## 4.2. Temporal variability of PRI at daily and seasonal scales

The canopy PRI variations at the seasonal scale are shown in Fig. 6. The temporal patterns of PRI were similar to those of  $mNDI_{705}$  for the three species. At the intra-daily scale, the PRI shows strong temporal variations that are related to sky conditions, as shown in Fig. 7, which illustrates the daily variability of PRI and PAR under two contrasting sky conditions.



*Fig. 6: Temporal dynamics of PRI throughout the experiment for the three species (blue full circle denotes the canopy PRI; black continuous line denotes the moving median PRI; shaded area denotes the 95% tolerance intervals).*

The PRI variations were directly related to incident PAR temporal variations, although the patterns were opposite. Under a clear sky, the PAR increased continuously during the morning, which rapidly decreased the PRI. Subsequently, the PRI reached a stable value before noon (~9 AM) that corresponded to ~300 micromoles of incident PAR for the two considered days. The occurrence of clouds directly affected the PRI, which fluctuated in an opposite pattern. At the end of the day, decreasing the PAR increased the canopy PRI.

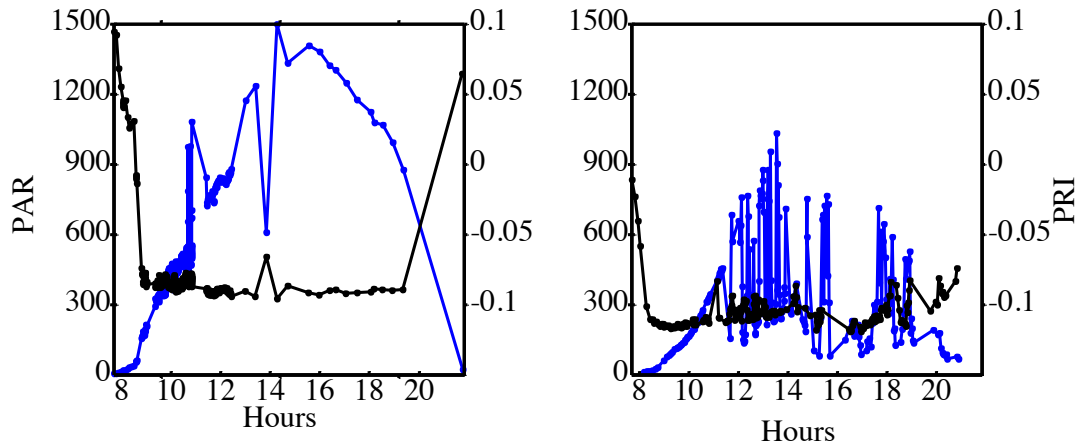


Fig. 7: Intra-daily variations of PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , in blue) and canopy PRI (in black) between 8 AM and 8 PM (left - control pine at DOY 107; right - treatment oak at DOY 98).

The relationship between PRI and PAR was fit using Eq.3 for different days that corresponded to different phenological stages (Fig. 8).

The relationship between PRI and PAR was negative and exponential. For low radiation, this relationship began with a PRI value that was referred as  $\text{PRI}_0$  in Eq.3 and varied depending on the day considered. This offset between curves continuously increased between the 4 curves and corresponded to 4 different days between DOY 106 and DOY 220 in the control pine plot. Subsequently, the relationship reached a plateau for PAR values (referred to as  $\text{PAR}_{\text{sat}}$  in Eq.3), which appeared to vary with the date considered. The PRI variation range (referred to as  $\Delta\text{PRI}$  in Eq.3) remained relatively stable.

Temporal variations of the  $\text{PRI}_0$  and  $\text{PAR}_{\text{sat}}$  parameters estimated using Eq.3 for different days throughout the budburst to senescence period are illustrated in Fig. 9. The temporal pattern of  $\text{PRI}_0$  at the seasonal scale was similar to that of  $\text{mNDI}_{705}$ , whereas the pattern of  $\text{PAR}_{\text{sat}}$  exhibited more temporal variability. The WMW tests indicated that “species” significantly affects  $\text{PRI}_0$  and  $\text{PAR}_{\text{sat}}$ . The differences between these treatments were not observed for  $\text{PRI}_0$  and  $\text{PAR}_{\text{sat}}$ , except for  $\text{PAR}_{\text{sat}}$  in oak species. The temporal pattern of  $\Delta\text{PRI}$

(not shown) was nearly flat with a strong dispersion, and differences between the species and treatments were not statistically significant.

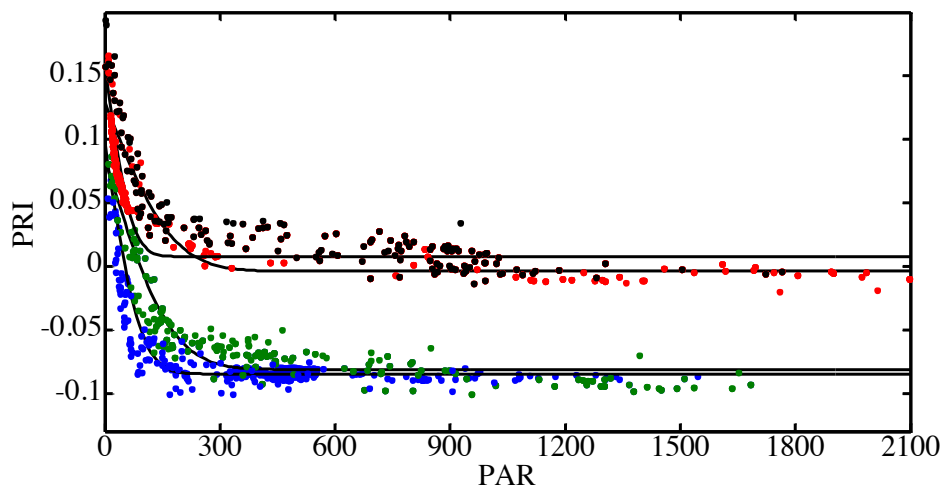


Fig. 8: Fitted canopy PRI versus incident photosynthetically active radiation ( $\text{PAR} - \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) for the control pine plot on different days (blue denotes DOY 106, green denotes DOY 117, red denotes DOY 216 and black denotes DOY 220).

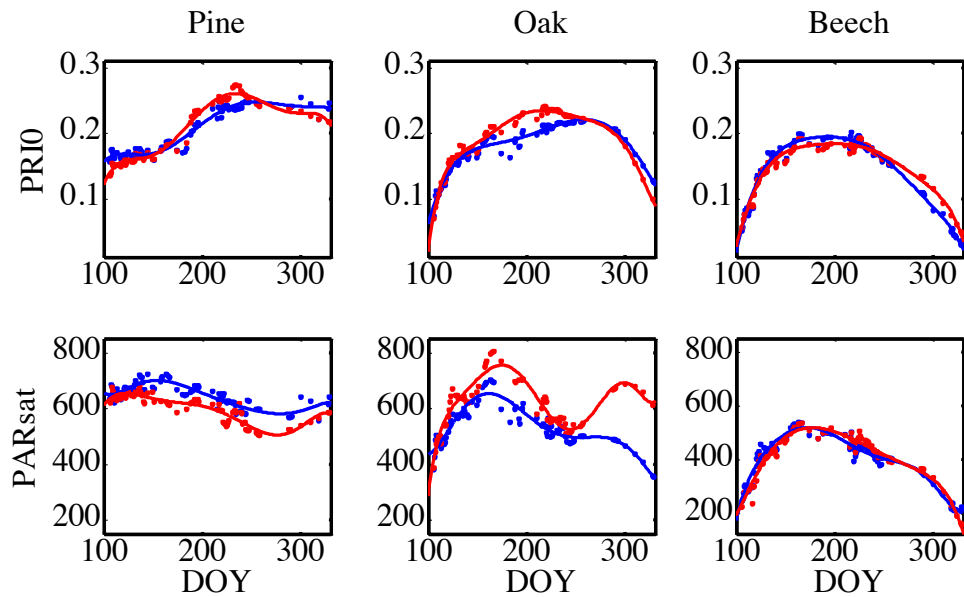


Fig. 9: The temporal dynamics of  $\text{PRI}_0$  and  $\text{PAR}_{\text{sat}}$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) during the growing season (control plots in blue and treatment plots in red).

### 4.3. Distinguishing between the structural and the physiological variability of the PRI

The estimated parameters ( $PRI_0$ ,  $\Delta PRI$  and  $PAR_{sat}$ ) in Eq.3 (shown in Fig. 9) are analyzed using a WMW test and simple linear regressions with  $mNDI_{705}$  and soil moisture content and are summarized in Table 2.

Between treatments and throughout the growing season, the WMW tests comparing the  $PRI_0$  values only showed statistically significant differences for the oak plots, and the  $PRI_0$  was significantly lower in the treatment plot (Table. 2).

Variables	$PRI_0$				$PAR_{sat}$			
	Pine Plots n=159	Oak Plots n=157	Beech Plots n=159	All plots n=477	Pine Plots n=159	Oak Plots n=157	Beech Plots n=159	All plots n=477
Canopy chlorophyll content	0.19 (0.011) ***	0.18 (0.008) ***	0.19 (0.005) ***	0.20 (0.003) ***	-116.59 (40.66) **	417.09 (28.48) ***	365.44 (12.75) ***	396.72 (11.23) ***
Soil moisture content	-0.21 (0.03) ***	-0.01 (0.025) ns	0.10 (0.048) *	-0.03 (0.011) **	295.98 (112.68) **	1401.10 (90.59) ***	827.85 (112.96) ***	1416.05 (39.11) ***
Constant	0.13 (0.012) ***	0.09 (0.009) ***	0.07 (0.008) ***	0.091 (0.003) ***	638.12 (46.38) ***	51.35 (32.43) ns	168.17 (18.83) ***	75.36 (10.79) ***
$R^2$	0.94 *** df=157	0.89 *** df=155	0.89 *** df=157	0.91 *** df=475	0.46 *** df=157	0.63 *** df=155	0.84 *** df=157	0.81 *** df=475

Table 2. Goodness of the  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  regressions for  $mNDI_{705}$  and the soil moisture contents for the entire dataset (estimate value (standard error); \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively).

For all plots, the multiple linear regressions of  $PRI_0$  with  $mNDI_{705}$  and soil moisture, as explanatory variables, were highly significant ( $R^2=0.92$ ,  $p < 0.001$ ) (Table 2). These results were mainly explained by the strong linear relationship between  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$ . Soil

moisture, despite its statistical significance in the “all plots” model, contributed less than 1% of the explained variance. The effects of soil moisture on the variations of  $PRI_0$  were not significant in the oak plots and were maximized at approximately 2% of the explained variance in the pine plots. In addition, a comparison of the three multiple regression models adjusted independently per species indicated no statistically significant differences between the slopes of the  $PRI_0$  vs  $mNDI_{705}$ . The relationship between  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$  throughout the growing season is shown in Fig. 10a.

Between treatments and throughout the growing season, the WMW tests comparing the  $PAR_{sat}$  showed statistically significant differences between the mean values for the pine and oak species, but not in the beech plot. The  $PAR_{sat}$  value was significantly lower in the treatment plots for these two species.

The  $PAR_{sat}$  value was dependent on both the  $mNDI_{705}$  and soil moisture content (Table 2). This relationship was highly significant when all of the plots were pooled or when each species was considered. In the full model (all plots included),  $PAR_{sat}$  is positively correlated with  $mNDI_{705}$  and the soil moisture content. The contributions of these variables to the amount of total explained variance (80.57% - Table 2) were approximately 33% and 66%, respectively. Per species,  $PAR_{sat}$  was positively correlated with  $mNDI_{705}$  and soil moisture, except in the pine plots. In the pine plots,  $PAR_{sat}$  was negatively correlated with the soil moisture content, although soil moisture in the “pine plots” model only contributed approximately 5% of the total explained variance.



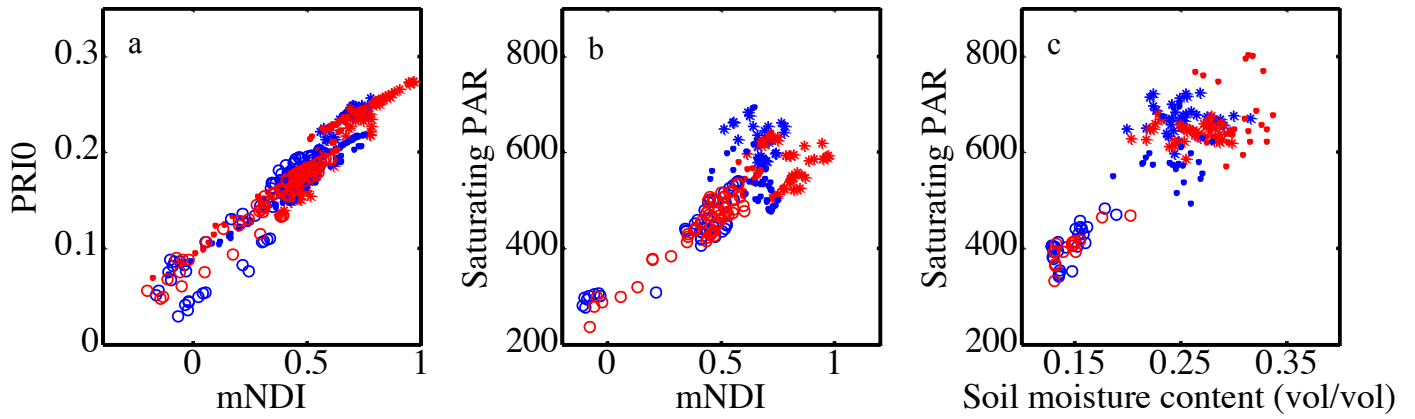
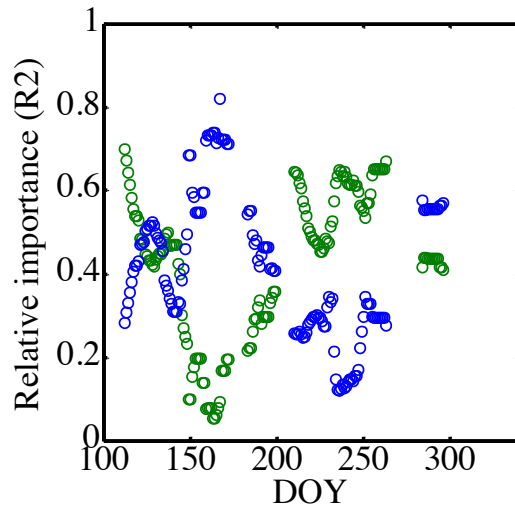


Fig. 10: (a) - Relationships between  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$ , - Relationships between (b)  $PAR_{sat}$  and  $mNDI_{705}$  and (c)  $PAR_{sat}$  and soil moisture (control plots shown in blue and treatment plots shown in red; points denote oak, empty circles denote beech, and stars denote pine plots).

The relationships of  $PAR_{sat}$  with  $mNDI_{705}$  and soil moisture content are shown in Fig. 10b and 10c. These figures are based on multiple regressions between  $PAR_{sat}$  and  $mNDI_{705}$  and soil moisture. The residuals between the data and predicted  $PAR_{sat}$  from the multiple regressions are calculated by including one regression coefficient at a time. For three parameters ( $PAR_{sat}$ , soil moisture,  $mNDI_{705}$ ), the  $PAR_{sat}$  was more correlated with one variable when the residues for this variable were lower.

To better identify the roles played by each of the two explanatory variables ( $mNDI_{705}$  and soil moisture) in the daily temporal variability of  $PAR_{sat}$ , the total explained variance is decomposed into individual contributions using the methodology described in the Materials and Methods section (2.3). Fig. 11 illustrates the temporal patterns of the contributions of  $mNDI_{705}$  and soil moisture to the total explained variance of  $PAR_{sat}$  in all plots and throughout the experiment.



*Fig. 11: Relative importance of the canopy chlorophyll content and soil moisture content for the variability of  $PAR_{sat}$  throughout the experiment, from spring budburst to autumn senescence (green circles indicate canopy chlorophyll content and blue circles indicate soil moisture content).*

This temporal pattern highlighted the complexity of the response of  $PAR_{sat}$  (and the PRI) to temporal changes in the canopy properties and soil moisture. Phenology appeared to be the main factor that explained the variability of  $PAR_{sat}$  during the budburst and leaf area expansion stages. During this period, greater canopy leaf area was accompanied by an increase in the leaf chlorophyll content. The effects of this phenological stage were gradually attenuated as more days were incorporated into the calculation window during the relative stability phase of the LAI and leaf chlorophyll content. Subsequently, the effects of soil moisture became more significant from DOY 150 to DOY 200. Despite the relative stability of the LAI, the effect of  $mNDI_{705}$  became more important from DOY 200 to DOY 300, which could be explained by an increase in the canopy  $mNDI_{705}$ , particularly in oak plots.

As indicated, the temporal patterns of  $\Delta PRI$  were flat. The WMW tests indicated that no significant differences occurred between the treatments, except in the pine plots, for which a small but significant difference ( $p < 0.03$ ) was observed. The multiple regression analyses did not show any significant dependency of the  $\Delta PRI$  on the soil water content or  $mNDI_{705}$ .

## 5. Discussion

Six plots of three sapling species (pine, oak and beech) subjected to contrasting soil moisture conditions (Fig. 1a) are monitored for one year at an intra-daily frequency. The experiment begins at budburst in April and ends at senescence in December. Fig. 2b shows small phenological changes in the evergreen species (pine) and four contrasting phenological stages in the two temperate deciduous species (oak and beech) that were characterized by the non-leafy season during autumn, budburst and foliar expansion during the spring, leaf maturation and maximum canopy cover during the summer and finally leaf coloring and abscission of the oak species during the autumn. Dead leaves were retained until the emergence of new juvenile leaves during the autumn and early spring for beech. Biochemical changes at the canopy scale were investigated using continuous spectral measurements. The  $mNDI_{705}$  is a good indicator of chlorophyll content at the leaf scale (Sims and Gamon, 2002), which was confirmed at the canopy scale by the strong relationship between canopy  $mNDI_{705}$  and the average sunlit leaf chlorophyll content in the deciduous species (Fig. 3). During the growing season,  $mNDI_{705}$  is primarily determined by the biochemical properties of the upper layer of the canopy. The temporal patterns of  $mNDI_{705}$  (Fig. 4) measured over the three species were similar to those of the absorbed PAR. During a short period in late June, an unexpected decrease in the  $mNDI_{705}$  occurred in both oak and beech plots, which likely resulted from an important decrease in soil moisture (16%) that lasted approximately 20 days and introduced a loss in the leaf chlorophyll content that corresponded with drought and high temperatures in July 2013. No significant differences were found between the treatments for  $mNDI_{705}$ .

The Xanthophyll content was observed in the range described in previous studies for woody plants, and an additional VAZ content was observed in the sunlit leaves (García-Plazaola et al. 2000; Gallé et al. 2007; Thayer and Bjorkman. 1990; Demmig-Adams &

Adams. 1992). The seasonal dynamics of the xanthophyll pool size showed a significant reduction in the VAZ content for deciduous species during the year. Other studies have shown variations in the dynamics of the xanthophyll pool (Garcia-Plazaola et al. 1997; Filella et al. 2009). The size of the pool depends on the development stage and changes with the light regime (Demmig-Adams. 1998; Liakopoulos et al. 2006). Moreover, despite the high conversion of xanthophyll into zeaxanthin (99%), the conversion was not complete and the unconverted violaxanthin remains observable in Fig. 5b. This result shows that an unavailable pool of violaxanthin remains that is proportional to the chlorophyll content ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$ ). In addition, this result is consistent with the results obtained by Siefermann-Harms (1984), who used in vitro studies and indicated that two pools of violaxanthin occur, one (i) that is available for conversion in the lipid matrix of the thylakoid membranes and another (ii) that is unavailable for conversion in the light-harvesting chlorophyll protein and photochemically active photosystem complexes.

As shown in Fig. 6, the seasonal patterns of the canopy PRI over the three species are similar to those of the  $mNDI_{705}$ , which suggests that the PRI is strongly sensitive to chlorophyll content and canopy structure dynamics. These last results are similar to those found at the leaf scale by Hmimina et al. (2013) and at the canopy scale by Hmimina et al. (2015) and are consistent with the results of previous studies (Filella et al. 2004; Garbulsky et al. 2011; Rahimzadeh-Bajgirani et al. 2012; Gamon and Berry 2012). At the intra-daily scale, the PRI shows important temporal variability that is strongly related to solar radiation (Fig. 7), which was also reported by Louis et al. (2005) and Gamon et al. (2015). Indeed, the PRI was highly dependent on the incident PAR variations in a nonlinear fashion. The PRI decreased when the PAR increased and was saturated at a given value of PAR.

$PRI_0$  exhibited a temporal pattern near  $mNDI_{705}$  for the three species (Fig. 9), and a strong linear correlation between  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$ , as shown in Fig. 10a and Table 2.  $PRI_0$  was

highly dependent on the entire canopy chlorophyll content, which was dependent on the leaf chlorophyll content and the canopy leaf area index (Barton & North, 2001), and this relationship was maintained throughout the growing season, including during the budburst and senescence periods.

$PAR_{sat}$  corresponds to the value of PAR when the PRI reaches a relatively stable value. The observed  $PAR_{sat}$  values were in the same range as those observed in previous studies (Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012; Gamon et al. 2015; Louis et al. 2005) and exhibited a temporal pattern that was similar to that observed for  $mNDI_{705}$  (Fig. 9). Furthermore, a significant linear relationship was observed between the two variables (Fig. 10b and Table 2). Nevertheless, the  $PAR_{sat}$  presented greater temporal variability compared with the  $mNDI_{705}$ . In addition,  $PAR_{sat}$  was also strongly correlated with the soil moisture content (Fig. 10c and Table 2). As shown in Fig. 11 and Table 2, the contributions of  $mNDI_{705}$  and soil moisture content to the temporal variability of  $PAR_{sat}$  were dependent on time.

In this study, changes in  $\Delta PRI$  were not observed, which was consistent with the findings of Hmimina et al. (2015) and Gamon and Surfus (1999), and correlations with the VAZ content were not observed.

Based on these results and those reported in Hmimina et al. (2015), the canopy PRI was decomposed into two components, (i) a structural component described by  $PRI_0$  that is linked to canopy chlorophyll content (leaf chlorophyll content and leaf area index) and (ii) a physiological component described by  $PAR_{sat}$  that is linked to both soil moisture and canopy chlorophyll content.

No relationship was observed between the xanthophyll pool size and  $PAR_{sat}$  or  $\Delta PRI$ . Leaves were sampled when the plants were exposed to excess light; thus, the conversion state of xanthophyll was maximized and no variations related to the conversion state were expected

(99% of the VAZ pool size is in the zeaxanthin and antheraxanthin forms). The lack of a relationship between the  $\Delta$ PRI and xanthophyll pool size can be explained by the link between  $\Delta$ PRI and the ratio between the de-epoxidated VAZ content (Z+A) and the total VAZ pool, which remained constant throughout the year. Many studies have shown that the PRI is sensitive to the ratio Z+A/VAZ (Demmig-Adams & Adams 1996; Filella et al. 2009; Porcar-Castell et al. 2012; Gamon et al. 2015). However, further studies should be performed to quantify the links between xanthophyll pools and the PRI amplitude variations according to PAR.

The link between  $PAR_{sat}$  and the soil moisture content was obscured by its correlation with  $mNDI_{705}$  during budburst and senescence periods, which could be explained by the high variability of the chlorophyll content during these two phenological stages. When the chlorophyll content became less limiting and reached its maximum value, the soil moisture content became the main parameter that governed the value of  $PAR_{sat}$ . Consequently, the variability of  $PAR_{sat}$  during the summer growing season was mainly explained by the soil moisture content during this experiment, which indicated that the PRI was sensitive to soil water. Water availability may limit photosynthesis rates and result in the earlier establishment of NPQ to protect the plant from excess energy. NPQ processes occur even earlier than the soil moisture deficit is important and are indicated by the positive relationship between  $PAR_{sat}$  and soil moisture content.

$PRI_0$ ,  $PAR_{sat}$  and  $\Delta$ PRI describe the responses of the PRI to PAR and can be used to decompose the sources of PRI variability. The structural component of the canopy described by  $PRI_0$  explained the variability of the PRI at coarse temporal and spatial scales (at a few days and seasonal scales, with heterogeneity across scales) and was primarily dependent on the seasonal variations of the canopy biochemical and structural properties (LAI). However,

the physiological component described by PAR<sub>sat</sub> explained the variability of the PRI that was dependent on the soil moisture and canopy chlorophyll contents.

Finally, these three parameters summarized the responses of the PRI to incident radiation and PAR according to an ecophysiological framework and provided a functional interpretation of the PRI measurements at the leaf and canopy scales.

## 6. Conclusions

This study aims to assess the sources of canopy PRI variability for three species, including two deciduous (oak and beech) and one evergreen (Scots pine) species, with different water statuses. Spectral measurements were achieved at a high temporal resolution throughout the growing season from budburst to senescence phenological stages.

The PRI was driven by confounding factors at the seasonal scale, especially leaf chlorophyll pigment content, canopy cover and soil moisture content. The seasonal pattern of the PRI was similar to the seasonal variability of mNDI<sub>705</sub>, which integrated the temporal changes of the leaf chlorophyll content and the canopy phenology.

At the daily scale, the PRI mainly responded to incident PAR variations. Three parameters that describe the daily PRI vs. PAR response were estimated. PRI<sub>0</sub>, corresponding to the PRI of perfectly dark-adapted leaves, was highly correlated with the mNDI<sub>705</sub> ( $R^2=0.92$ ,  $p<0.001$ ). PAR<sub>sat</sub>, which corresponded to the PAR value when the PRI indicated saturation, was explained by the entire canopy chlorophyll content and the soil moisture content with different contributions, depending on the phenological stage. PAR<sub>sat</sub> was determined from the soil moisture content during the summer growing season, and PAR<sub>sat</sub> was determined from the canopy chlorophyll content during budburst and senescence. The daily range of the PRI caused by the incident PAR variations,  $\Delta$ PRI, remained stable throughout the entire season.

However, a decrease in the xanthophyll (VAZ) pool occurred throughout the year. These results may imply that  $\Delta$ PRI depends on a xanthophyll ratio that remains stable between days.





## **CHAPITRE III**

**Potential use of the PRI and active fluorescence  
to diagnosis the physiological state of plants  
under drought and ozone stress**



# **Potential use of the PRI and active fluorescence to diagnosis the physiological state of plants under drought and ozone stress**

---

Elodie Merlier<sup>a</sup>, Gabriel Hmimina<sup>a</sup>, Matthieu Bagard<sup>b</sup>, Eric Dufrêne<sup>c</sup>, Kamel Soudani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ecologie Systématique Evolution, Univ. Paris-Sud, CNRS, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France

<sup>b</sup> Université Paris-Est Créteil Val de Marne, UMR 7618, Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris, Créteil, France

<sup>c</sup> CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, F-91405, Orsay, France.

Corresponding author: [elodie.merlier@u-psud.fr](mailto:elodie.merlier@u-psud.fr)

## 1. Abstract

In this study, we assessed changes in the responses of PRI (photochemical reflectance index) to ozone exposure and atmospheric water deficit (separately and combined) in oak (*Quercus robur*) and holm oak (*Quercus ilex*) that were planted in climatic cells under controlled conditions. Leaf-scale measurements were performed for the biochemical, physiological and spectral properties, PRI in dim light on dark-adapted leaves ( $PRI_0$ ), PRI responses to PAR variations (photosynthetically active radiation), and leaf chlorophyll fluorescence parameters. These data were used to investigate the biochemical and physiological components of variations in the PRI. The results show that the  $PRI_0$  is highly correlated with the leaf chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters ( $F_0$ ,  $F_m$ ) for both species and in all treatments.

The AOT40 (accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb) was used as an indicator of the strength of ozone-induced stress, and the EA (evaporative demand of the surrounding atmosphere) was used as an indicator of the atmospheric water deficit. The  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  (estimated PAR value at PRI saturation using PRI vs. PAR relationships) values were correlated with the AOT40 and EA for both species. The regression slopes of the  $PAR_{sat}$  vs. AOT40 and  $PAR_{sat}$  vs. EA relationships remained constant for all treatments and species, suggesting that  $PAR_{sat}$  can be considered as the physiological component of PRI variability, which is independent of the leaf biochemical properties.

*Q. ilex* is more resistant to drought stress relative to *Q. robur*. The succession of stress conditions, namely atmospheric water deficits followed by ozone stress, induced important variability in the leaf properties of *Q. ilex* but not in the leaf properties of *Q. robur*. The relative resistance of *Q. robur* to ozone stress may have been related to stomatal closure caused by the previous drought stress sensibility.

The  $PRI_0$  was used to correct the PRI which led to a corrected index ( $PRI_c$ ). This correction increased the strength of the relationships between the PRI and NPQ (non-photochemical quenching), which is linked to the xanthophyll cycle. These results provide new insights into the use of the PRI signal as a proxy for photosynthetic activity.

## **2. Introduction**

Photosynthesis is driven by the conversion of solar energy into chemical energy. However, the photosystem cannot utilize all of the absorbed light, particularly under full-sun exposure when the light energy flux exceeds the photosynthesis rate. Cases of light energy that exceed the photosynthesis capacity are common and well known (Powels 1984; Müller et al. 2001), and the surplus energy presents a danger to the plant and must be evacuated. The energy that exceeds the capacity of utilization by photochemistry is rapidly dissipated as heat or re-emitted as light by chlorophyll fluorescence. These protection mechanisms are reversible and referred to as non-photochemical quenching (NPQ). Dissipation by heat, the primary mechanism to dissipate excess excitation energy (Demmig-Adams & Adams 1992; Horton & Ruban 2005), requires the activation of the violaxanthin de-epoxidase enzyme (VDE) in the antenna complexes of the photosystem (Thayer & Björkman 1992; Bassi et al. 1993; Ruban et al. 1994; Lee & Thornber 1995; Yamamoto & Bassi 1995). This enzyme allows to redirect the energy usage from chlorophyll to xanthophyll cycle for the NPQ (Gilmore & Yamamoto 1993; Adams et al. 1995). VDE converts violaxanthin into zeaxanthin via antheraxanthin and is activated by the gradient of pH related to the proton gradient on both sides of the thylakoid membrane, which is characteristic of excess light.

Environmental stress limits the photosynthetic activity and potential growth of vegetation. Moreover, the increase in excess excitation energy can lead to the formation of reactive oxygen species (ROS). Most stress conditions involve similar plant responses that alleviate the effects of excess energy absorption. These response mechanisms primarily

involve stomatal closure followed by photoinhibition mechanisms linked to NPQ. Photoinhibition processes cause a reduced yield of photosynthesis that decreases the plant's ability to use the light energy. Regardless of the stressor, if the stress persists, then the use of such mechanisms may cause severe damage to the plant and lead to a loss of plant vitality and productivity. Climate events such as drought represent stresses that can significantly affect plant productivity and cause leaf browning and early leaf loss (Carnicer et al. 2011). Chronic exposure to an air pollutant can also cause yield losses (Ali 1993; Dizengremel et al. 2008, 2009, 2012), which affects the photosynthetic capacity of photosystems. Ozone is considered the most important phytotoxic air pollutant, especially in the Mediterranean region (Lorenzini et al. 1994; Velissariou et al. 1996). Ozone has a high oxidative capacity and induces ROS that can impair the light and dark reactions of photosynthesis (Francini et al. 2007). Similar to other plant stress factors, ozone affects the photosynthetic performance and biochemical processes of plants.

The effect of climate events and pollution on photosynthesis and on plants in general must be monitored for the early detection of damage. Two approaches are commonly implemented to monitoring the effects of climate events on plants: based on chlorophyll fluorescence and spectral properties. Fluorescence-based indicators of photosynthetic functioning at leaf scale can be estimated when the leaf is subjected to a strong pulse-amplitude-modulated (PAM) light used to excite chlorophyll fluorescence, and several parameters related to photosynthesis and other energy dissipation processes can be determined (Owens 1994; Heath 1996; Flexas et al. 2000). Nevertheless, the use of active fluorescence is not applicable on larger scales. Passive sun-induced fluorescence is another approach to determining the response of photosynthesis to environmental conditions, particularly climatic variations. A number of studies have shown that it is possible to track the status of carbon ecosystem functioning based on satellite fluorescence (Joiner et al., 2011; 2013; Guanter et al., 2010; Yoshida et al., 2015; Detmers et al., 2015).

The second approach is based on the use of remote sensing and tracks changes in optical reflectance signals, and increasing interest has been focused on the photochemical reflectance index (PRI) signal. The PRI, developed by Gamon et al. (1990), is based on changes in reflectance at 531 nm, related to the conversion of violaxanthin to zeaxanthin (prior to heat dissipation), as well as a reference band at 570 nm. The PRI has been shown to be effective at tracking the light use efficiency (LUE) of a wide range of species under different conditions at the leaf and canopy scales (Garbulsky et al. 2011). However, recent studies have shown that leaf pigment contents play a major role in the variability of the PRI, and it can mask the PRI vs. LUE relationship or blur its interpretation (Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012). Indeed, the PRI is a composite signal that responds to the physiological properties of leaves, which may be linked to photosynthetic functions, as well as the biochemical properties of leaves, such as chlorophyll content (Garbulsky et al. 2011; Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012; Hmimina et al. 2013, 2015; Merlier et al. 2015). In Hmimina et al. (2013; 2015) and Merlier et al. (2015), the physiological and biochemical sources of PRI variability at the leaf and canopy scales were deconvoluted using PRI measurements at low radiation levels, which were determined immediately after leaf dark adaptation ( $PRI_0$ ) at the leaf scale (Hmimina et al. 2013) or estimated from the PRI vs. PAR (photosynthetically active radiation) relationship at the canopy scale. The  $PRI_0$  is strongly correlated to the leaf chlorophyll content at both the leaf and canopy scales. However, the corrected PRI, which was obtained by subtracting the pigment-related variability ( $PRI_0$ ) from the PRI measurement, was highly correlated with the LUE measurements that expressed the physiological variability of the PRI.

In this study, we further investigated the dependence of the PRI on the leaf biochemical and physiological properties under stress conditions. Indeed, the deconvolution of different sources of PRI variability under stress conditions has not been sufficiently studied, and the effective scope of the PRI as an indicator of plant stress deserves to be evaluated carefully. In this work, we studied the responses of the PRI at the leaf scale under abiotic stresses in



controlled conditions. The main objectives were to 1) investigate the PRI responses to abiotic stress induced by ozone and atmospheric water deficit (separately and combined); 2) study the strength of the relationships between the parameters derived from the PRI variations and the factors linked to abiotic constraints; and 3) use these relationships to separate the phenological components from the physiological components of PRI variability.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Experimental design, conditions and plant material.**

The experiment was conducted under controlled conditions using environmental cells in the Ecolab, which is available at the CEREEP-Ecotron (Research Centre in Experimental and Predictive Ecology, CNRS/ENS, Foljuif, France). The Ecolab is a modular autonomous structure consisting of three climate chambers (13 m<sup>3</sup>) that can be controlled independently for air humidity, temperature, light quality and quantity, rainfall and certain atmospheric gas concentrations, such as ozone and carbon dioxide (Verdier et al. 2014).

Two-year-old saplings of oak (*Quercus robur* L.) and holm oak (*Quercus ilex* L.) were maintained in garden pots and separated into the 3 environmental cells, with 7 pots of each species in each cell. During the experiment, which lasted 5 weeks, the first cell was used as a control and the other were used as treatments. The parameters under control were air temperature, air humidity, light and water and the concentrations of CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. In the three cells, natural light conditions were mimicked using a daily pattern maintained for 14 hours in the dark and 10 hours in the light using a lamp (model POWERSTAR HQI-BT 400 W/D PRO, OSRAM, Molsheim, France).

The temperature of the three cells was kept constant at 25°C during the diurnal period and at 17°C during the nocturnal period, the relative air humidity was maintained at 60% (except in the “air humidity” treatment, referred to as RH hereafter), the CO<sub>2</sub> concentration was 350 ppm and the O<sub>2</sub> content was 21%. In the control cell, the parameters remained stable

throughout the experiment. In the RH treatment, air humidity was decreased from 80% to 30% in intervals of 10% to provoke atmosphere-induced plant water stress conditions. In the third cell, the “ozone” (referred to as OZ hereafter) treatment consisted of plants submitted to oxidative stress caused by chronic elevated ozone exposure (maintained automatically at 100 ppb for 4 hours per day).

Throughout the experiment and for each cell, the biochemical, physiological and optical properties of the leaves were monitored. The biochemical properties were related to the leaf chlorophyll content, whereas the physiological properties were related to the chlorophyll fluorescence parameters. Finally, the observed optical properties were related to the reflectance spectra in the bands of the PRI and  $mNDI_{705}$ .

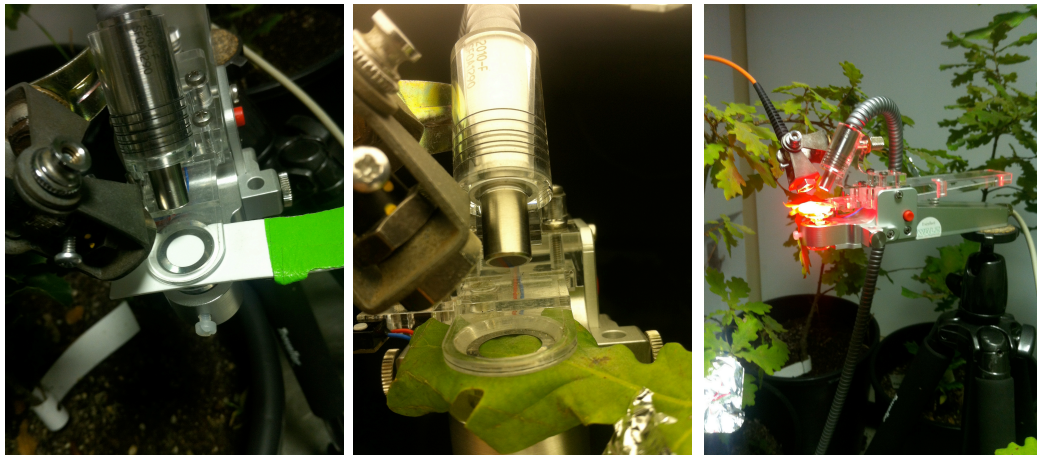
During the experimental period, 10 leaves (kept on plant) of each species are sampled in each cell and every day (Fig. 2). The leaf biochemical properties were estimated using the SPAD-502 meter (Konica-Minolta, Tokyo, Japan) and the DUALEX® meter (FORCE-A DUALEX meter, Orsay, France).

The leaf physiological and optical measurements were measured on the subsequent day on the same leaves used for the biochemical measurements, which were previously wrapped in aluminum foil to avoid illumination during the 8 hours required for the fluorescence measurements.

A portable fluorometer with a leaf clip (PAM 2500, Walz, Effertlich, Germany) was used to measure the chlorophyll fluorescence. An optical fiber connected to a spectrometer (ASEQ, LR1-T spectrometer; 300-1000 nm; 0.6 nm spectral resolution; TEC module; 1 m 600  $\mu$ m core VIS-IR fiber; Vancouver, Canada) that was directed towards the same area sampled by the PAM was used to obtain the spectral measurements (Fig. 1).

The measurements were performed according to the following order: first, the aluminum foil was removed and the minimal fluorescence ( $F_0$ ) was measured; then a dim

light (approximately  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PAR on the leaf) was switched on using an LED panel (LED PLC230V303-BN, CONRAD, 20 W, 4000 K) and a series of spectra were measured for the same area used in the fluorescence measurement; and finally, a “reference” spectrum was measured over a spectralon panel at 98% under the same configuration used with the leaves.



*Fig. 1: Experimental design: a leaf clip was used to acquire the fluorescence measurements as well as the spectral measurements, and the same field of view was used: above a reference spectralon panel, above a sampled leaf and during the kinetics display on a leaf.*

Subsequently, two distinct protocols were used. The first protocol involved half of the leaves (5 of each species and for each treatment), which were instantaneously removed and immersed in nitrogen liquid. The leaves were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  and used in the pigment quantification as described below.

The second protocol involved the other half of the leaves, which was used to investigate the PRI and chlorophyll fluorescence responses to PAR radiation. A light kinetic was applied to these leaves for 6 minutes to simulate increasing and decreasing levels of PAR using only the red light of the PAM 2500 to avoid reflectance variations caused by light in the wavelength used for the PRI. Optical measurements were acquired every second, and fluorescence measurements were acquired each minute on the same area of the leaf (Fig. 1).

After 2 weeks from the start of the experiment, 3 pots of each species were moved from one treatment to the other one to study the impacts of successive stress. Therefore, 6 pots (two species) from the “OZ” treatment cell were placed into the “RH” treatment cell and 6 pots from the “RH” treatment cell were placed into the “OZ” treatment cell (Fig. 2).

DOY	203	204	205	210	211	212	217	218	219	224	225	226	231	232	233
Control		■			■			■			■			■	
RH	■		■	■		■			■			■			
OZ	■	■	■	■	■	■		■		■		■		■	
RH_OZ							■		■		■		■		■
OZ_RH							■			■			■		

Fig. 2: Temporal design of the cells sampled for each treatment. RH indicates the atmospheric water stress treatment, OZ indicates the ozone treatment, RH\_OZ indicates the plots in the OZ treatment after undergoing the RH treatment and OZ\_RH indicates the plots in the RH treatment after undergoing the OZ treatment.

### 3.2. Chlorophyll quantification

To quantify the chlorophyll content, 15  $\mu\text{g}$  of leaf material was extracted with 10 ml of methanol and stirred for 90 minutes at 45°C. The samples were then centrifuged for 5 minutes at 4000 g based on the method described by Cerovic et al. (2012). The absorption spectra of the sample solution were measured using a spectrophotometer (model HP 8453, Agilent UV-VIS, CA, USA). The absolute amount of chlorophyll ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) was calculated using the extinction coefficients for pure methanol given in Porra et al. (1989).

### 3.3. Data analysis

At each step of the experiment, the effects of the applied stresses were monitored using their cumulative effects. For the “OZ” treatment, the AOT40 (accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb) was calculated to determine the ozone impact on the leaves. The AOT40 (expressed in ppb) is the sum of the differences between the hourly ozone

concentrations greater than 40 ppb over a given period of time. In this study, the AOT40 was calculated daily. The threshold concentration of 40 ppb is commonly reported as the value at which significant damage can be observed on the vegetation (Karenlampi & Skärby 1996).

In the “RH” treatment, the effect of the air humidity state was expressed in terms of the evaporative demand of air to which the plant is subjected. This demand is expressed in mm of water and calculated using the formula in the Penman evapotranspiration equation:

$$EA = 0.26 \cdot [e(Ta) - ea] \text{ (Eq.1)}$$

where  $e(Ta)$  is the saturation vapor pressure (hPa) and  $ea$  the average water vapor pressure in the air (hPa).

In Eq. 1, the evaporative demand is only dependent on the temperature and relative humidity and assumes no wind or stomatal resistance to air advection.

Spectral measurements were performed below the LED panel, and the PRI and PRI<sub>0</sub> were calculated as described below:

$$PRI = \frac{(R_{531} - R_{570})}{(R_{531} + R_{570})} \text{ (Eq. 2)}$$

The PRI responses to PAR variations were analyzed using a non-linear regression based on the following expression given in Merlier et al. (2015):

$$PRI(t) = PRI_0 + \Delta PRI * erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat}}\right) \text{ (Eq.3)}$$

$$\text{with } erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat}}\right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{PAR(t)/PAR_{sat}} \exp^{-x^2} dx$$

where PAR<sub>sat</sub> and ΔPRI are parameters estimated using the mean square minimization and erf is the error function (also called the Gauss error function).

At the leaf scale, the chlorophyll content was also estimated using the  $mNDI_{705}$  (modified red-edge Normalized Difference Index; Sims & Gamon 2002) as shown in previous studies (Hmimina et al. 2013).

$$mNDI_{705} = \frac{(R_{715} - R_{705})}{(R_{715} + R_{705} - 2 * R_{445})} \quad (\text{Eq.4})$$

$R_{445}$ ,  $R_{531}$ ,  $R_{570}$ ,  $R_{705}$  and  $R_{715}$  are reflectances integrated over a 5 nm waveband centered on 445 nm, 531 nm, 570 nm, 705 nm and 715 nm, respectively. The signal at 750 nm that is usually used for the  $mNDI_{705}$  is noisy; thus, it was replaced by the signal at 715 nm.

The fluorescence data were used to derive different parameters. The  $Y(II)$  is the effective quantum yield of PSII (Genty et al. 1989), which expresses the photosynthesis rate. The  $Y(NPQ)$  is the fraction of energy dissipated via the regulated NPQ linked to heat dissipation and xanthophyll cycle (Genty & Harbinson 1996).  $Y(NO)$  is the fraction of energy passively dissipated in the form of heat and fluorescence, and it corresponds to NPQ because of photo-inactivation of PSII and constitutive thermal dissipation independent of the xanthophyll cycle (Genty & Harbinson 1996).  $Y(NO)$  may also be involved in the PRI when the predominant mode of excess energy dissipation does not involve the xanthophyll cycle (Busch et al. 2009).

Statistical analyses were performed in MATLAB. Analyses of the correlations between the fluorescence parameters, optical indices and pigment contents were determined using regressions between these variables. The relationships between PRI responses to PAR variations (Eq.3) were fitted using a non-linear optimization algorithm (interior-point algorithm). The relationships between parameters ( $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$ ) and explanatory variables (AOT40 and EA) were investigated using multiple regression analysis and slopes were compared between treatments and species.

## 4. Results

The chlorophyll contents were measured using direct measurements with the DUALEX and SPAD meters and after methanol extraction according to the spectrophotometric assay. Measurements of the chlorophyll content with DUALEX meter were validated in previous works (Louis et al. 2009; Cerovic et al. 2012) and in this study using chlorophyll content values obtained by spectrophotometry and SPAD (data not shown).

The relationship between  $mNDI_{705}$  (Eq.4) and leaf chlorophyll content using DUALEX is shown in Fig. 3. This relationship is highly significant ( $R^2=0.8$ ,  $p<0.001$ ) and validates the use of  $mNDI_{705}$  to estimate the leaf chlorophyll content. This relationship is species-dependent between *Q. robur* ( $R^2=0.42$ ,  $p<0.001$ ) and *Q. ilex* ( $R^2=0.40$ ,  $p<0.001$ ). Relationships were established among the physiological properties of the dark-adapted leaves obtained by fluorescence measurements ( $F_o$  and  $F_m$ ) and optical measurements in dim light ( $PRI_0$ ). For both species, the  $PRI_0$  was correlated with the measured leaf chlorophyll content (Fig. 4.a and Table 1;  $R^2=0.56$ ,  $p<0.001$ ). The strength of these relationships decreased when the species were considered independently ( $R^2=0.22$ ,  $p<0.001$  for both species). The  $mNDI_{705}$  was a good estimator of  $PRI_0$  when two species are grouped together ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$ ), and the strength of the relationship decreased when the species were separated, with a better correlation for *Q. robur* ( $R^2=0.32$ ,  $p<0.001$ ) than for *Q. ilex* ( $R^2=0.23$ ,  $p<0.001$ ). The  $F_v/F_m$  value, which is the quantum yield of the open centres of PSII, is correlated to  $PRI_0$  value for each species. The correlation between “ $F_m-F_o$ ” and  $PRI_0$  (Fig. 4.b and Table 1) was highly significant when the two species were pooled ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$ ) and for *Q. robur* independently ( $R^2=0.52$ ,  $p<0.001$ ), although the correlation was not as significant for *Q. ilex* ( $R^2=0.1$ ,  $p<0.001$ ).

The  $PAR_{sat}$  values varied significantly between days for *Q. robur* ( $p<0.05$ ) but not for *Q. ilex*, and it was not correlated with any of the variables listed in Table 1 when species are

considered independently. The relationships became weakly significant when species were pooled.

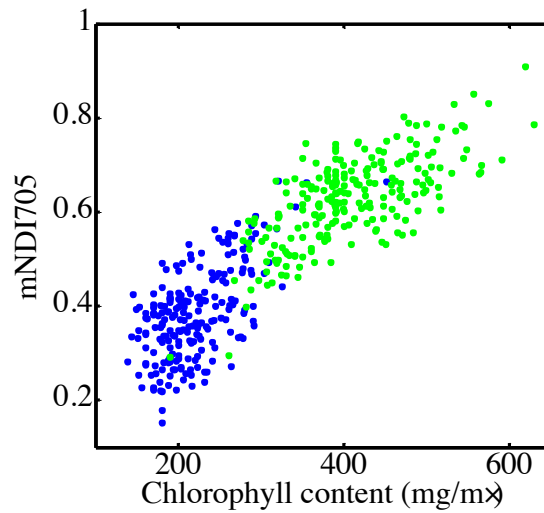


Fig. 3: Relationship between  $mNDI_{705}$  and chlorophyll content ( $mg/m^2$ ) for both species (*Q. robur* in blue and *Q. ilex* in green).

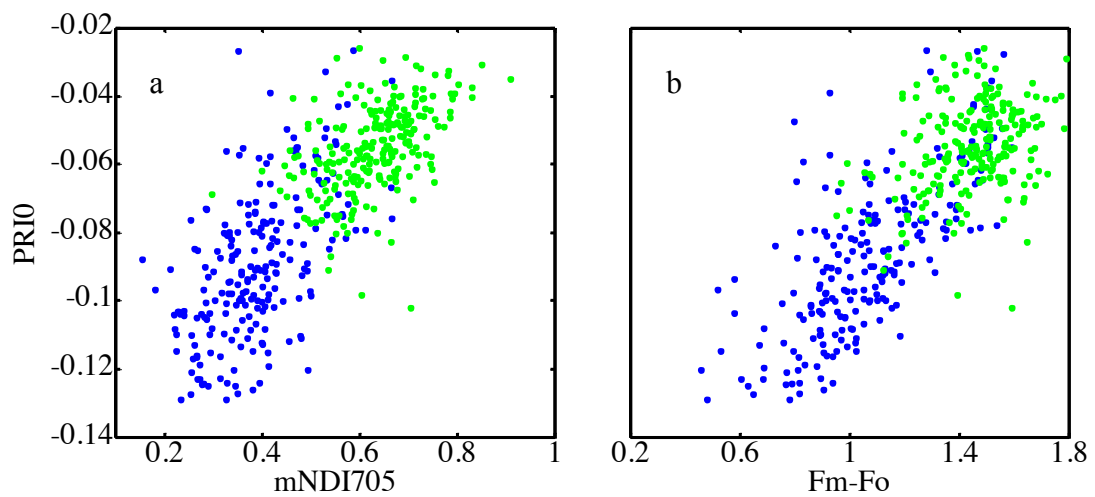


Fig. 4: (a) Relationship between the  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$  and (b) relationship between the  $PRI_0$  and ( $Fm-Fo$ ) for both species (*Q. robur* in blue and *Q. ilex* in green).



		Chlorophyll content (mg/m <sup>2</sup> )	mNDI <sub>705</sub>	Fo	Fm	Fm-Fo	Fv/Fm
PRI <sub>0</sub>	<i>Q. robur</i> n=296	0.22 ***	0.32 ***	0.23 ***	0.50 ***	0.52 ***	0.32 ***
	<i>Q. ilex</i> n=293	0.22 ***	0.23 ***	- ns	0.07 ***	0.1 ***	0.15 ***
	<b>Both species</b> n=589	0.56 ***	0.61 ***	0.34 ***	0.61 ***	0.61 ***	0.35 ***
PAR <sub>sat</sub>	<i>Q. robur</i> n=296	- ns	- ns	- ns	- ns	- ns	- ns
	<i>Q. ilex</i> n=293	- ns	- ns	- ns	- ns	- ns	- ns
	<b>Both species</b> n=589	0.0662 **	0.06 *	- ns	- ns	0.033 *	0.07 **

Table 1: Summary of the regression for mNDI<sub>705</sub>, Fo, Fm and Fm-Fo on PRI<sub>0</sub> and PAR<sub>sat</sub> for the entire dataset ( $R^2$ ; \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively).

The temporal dynamics of the PRI<sub>0</sub> and chlorophyll content for the entire dataset are shown in Fig. 5. The dynamics of the chlorophyll content in the control plot did not present significant difference between the beginning and end of the experiment for both species. The PRI<sub>0</sub> variability between days was significant for both species, particularly for *Q. robur* ( $p < 0.001$ ). A decreasing trend of the PRI<sub>0</sub> and measured chlorophyll content (in particular) was observed during the experiment and may have been caused by the low light conditions maintained in the cell.

The OZ treatment induced a significant decrease of PRI<sub>0</sub> and chlorophyll content for *Q. robur* and *Q. ilex* ( $p < 0.001$ ). For the *Q. ilex* species, the pots subjected to atmospheric water deficit (RH treatment) and the OZ treatment in the second stage (RH\_OZ) showed a significant decrease of chlorophyll content and a PRI<sub>0</sub> variability higher than that recorded in the RH treatment.

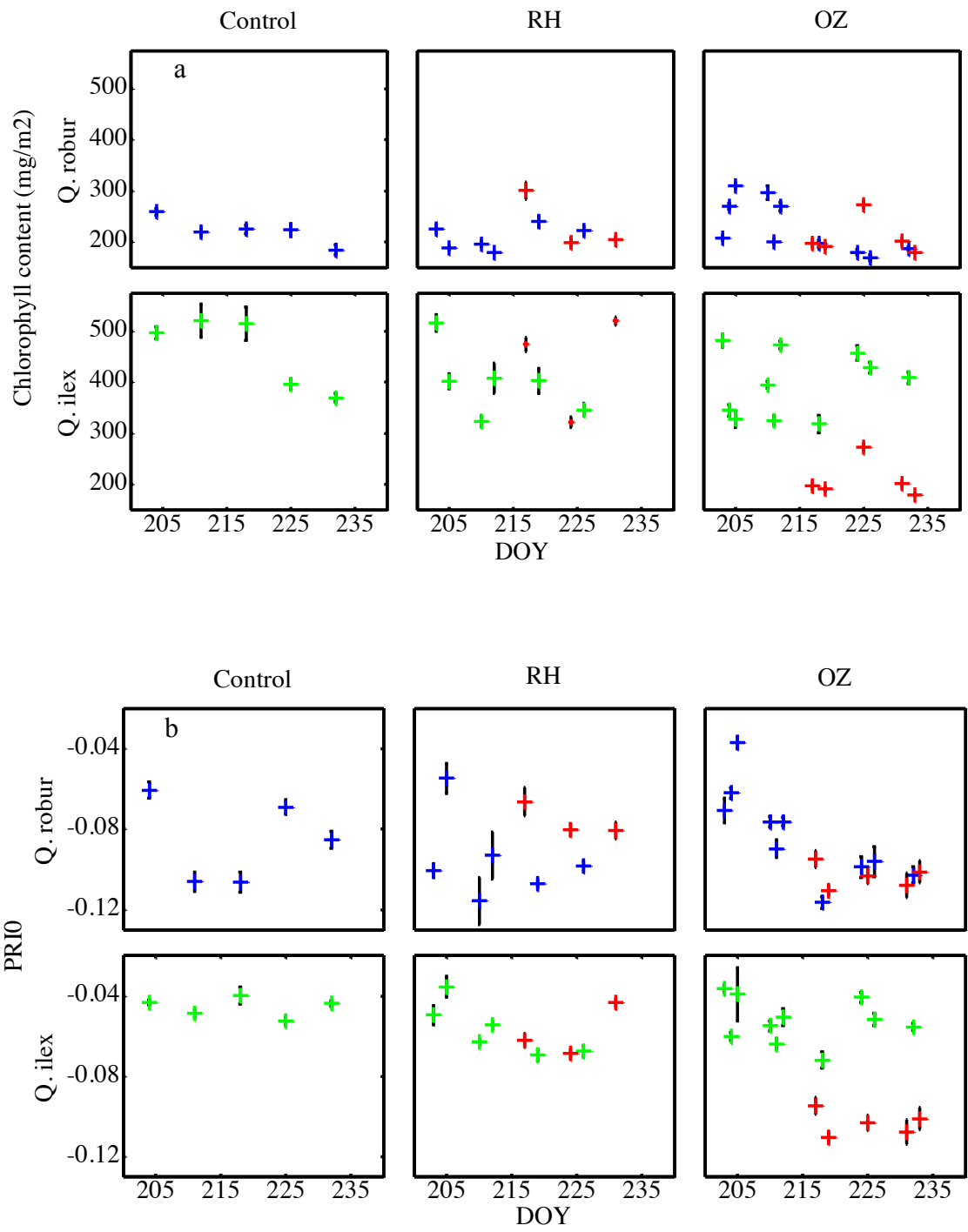


Fig. 5: Dynamics of the (a) chlorophyll content (mg/m<sup>2</sup>) and (b) PRI<sub>0</sub> for the entire experiment. RH represents the atmospheric water stress treatment and OZ represents the ozone treatment; dots in blue (Q. robur), green (Q. ilex) and red represent the combined RH-OZ treatment (atmospheric water deficit treatment followed by ozone treatment and vice-versa).

The effects of ozone and atmospheric water deficit on the parameters determined from Eq. 3, which summarize the PRI vs. PAR responses under different stress conditions, were assessed using multiple linear models. To determine the effects of ozone, the AOT40 was used as a predictor of changes in the  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  in the OZ and RH\_OZ treatments. To determine the effects of atmospheric water deficits, the air evaporative demand (Ea – Eq.2) was used as the explanatory variable in all of the treatments (control, RH and OZ). The RH data were measured within the three cells as described in section 2, and the results of these analyses are in Table 2.

The AOT40 explains the variability of  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  in a nuanced manner depending on the species. In *Q. robur*, the AOT40 explained 28% of the variance of  $PRI_0$ , and this relationship was significant in the two treatments OZ and HR\_OZ, whereas in *Q. ilex*, the relationship was only significant in the treatment HR\_OZ.

An increased amount of accumulative vapor deficit pressure induced  $PRI_0$  variations in both species. For *Q. robur*, this factor was significant in all of the treatments except OZ\_RH, whereas for *Q. ilex*, this factor was significant for all of the treatments except OZ and OZ\_RH.

Slopes of regressions between the two parameters ( $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$ ) and the two predictors (EA and AOT40) are made between species and between treatments. The relationship between the  $PRI_0$  and both the predictors (EA and AOT40) was different between the two species, with *Q. ilex* less impacted by the stressors. However, the slopes of the relationships between  $PAR_{sat}$  vs. EA and  $PAR_{sat}$  vs. AOT40 remained constant between species and between treatments. Therefore, the  $PAR_{sat}$  responses to stress led to a unique relationship.

	Control	RH	OZ	RH_OZ	OZ_RH	R <sup>2</sup> model	Pvalue model	Sample size	RMSE	
<b>AOT40 (ppb)</b>										
<i>Q. robur</i>	PRI <sub>0</sub>		*** -1.10e-05 (1.86e-06)	*** -2.21e-05 (3.51e-06)		0.28	***	128	0.0198	
	PAR <sub>sat</sub>		** -0.2281 (0.0741)	* -0.3149 (0.1363)		0.17	*	41	0.459	
<i>Q. ilex</i>	PRI <sub>0</sub>		ns	* -4.75e-06 (2.15e-06)		0.02	ns	130	0.013	
	PAR <sub>sat</sub>		ns	ns		-	ns	29	-	
<b>Both species</b>	PRI <sub>0</sub>		*** -6.83e-06 (1.67e-06)	*** -1.15e-05 (2.95e-05)		0.07	***	258	0.0245	
	PAR <sub>sat</sub>		** -0.1389 (0.0499)	* -0.1828 (0.0868)		0.09	*	70	0.398	
<b>EA (mm)</b>										
<i>Q. robur</i>	PRI <sub>0</sub>	ns -6.32e-05 (5.48e-05)	*** -2.99e-04 (6.58e-05)	*** -2.39e-04 (5.1e-05)	*** -3.07e-04 (5.21e-05)	ns	0.24	***	282	0.0203
	PAR <sub>sat</sub>	* -4.522 (2.2153)	** -8.2673 (2.9672)	*** -9.1385 (1.919)	*** -7.8729 (1.8957)	* -6.058 (2.7465)	0.23	***	83	0.461
<i>Q. ilex</i>	PRI <sub>0</sub>	* 7.75e-05 (3.38e-05)	*** -2.05e-04 (4.06e-05)	ns	* -7.29e-05 (2.88e-05)	ns	0.12	***	296	0.0122
	PAR <sub>sat</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	59	0.233
<b>Both species</b>	PRI <sub>0</sub>	ns	*** -2.54e-04 (5.58e-05)	*** -1.68e-04 (4.37e-05)	*** -1.52e-04 (4.16e-05)	ns	0.05	***	578	0.024
	PAR <sub>sat</sub>	ns	*** -6.0771 (1.7991)	*** -6.1876 (1.4209)	*** -5.1605 (1.3011)	** -5.2606 (1.6813)	0.15	***	142	0.416

Table 2: Relationships of the AOT40 (ppb) and EA (mm) with the PRI<sub>0</sub> and PAR<sub>sat</sub> for *Q. robur* and *Q. ilex* in the 5 treatments. The significance of the predictors is \*, \*\* and \*\*\*, which indicates significant effects at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. Estimates of coefficients with standard error. Control represents the control plants, RH represents atmospheric water deficit treatment, OZ represents the ozone treatment, RH\_OZ represents the plots in OZ treatment after undergoing RH treatment and OZ\_RH represents the plots in RH treatment after undergoing OZ treatment. Sample size: number of observations (leaves). RMSE: root mean square error.

To obtain a corrected PRI that is not linked to the structural and biochemical properties of the leaves, the  $PRI_0$  measurements were subtracted from the PRI measured with different intensities of PAR. The results of this deconvolution procedure are illustrated in Fig. 6, which shows the relationships between the fluorescence quantum yields and PRI before and after correction ( $PRI_c$ ). Quantum yield of photochemistry  $Y(II)$  shows a relationship with the PRI, although it disappears when  $PRI_0$  is subtracted from PRI ( $PRI_c$ ). The NPQ shows a significant correlation with the PRI ( $R^2=0.12$ ,  $p<0.001$ ) for the two species together. This relationship increases and becomes more consistent with  $PRI_c$  ( $R^2=0.32$ ,  $p<0.001$ ). The goodness of the fit of the relationship with  $Y(NO)$  does not change with the use of PRI or  $PRI_c$  ( $R^2=0.32$ ,  $p<0.001$  for both).

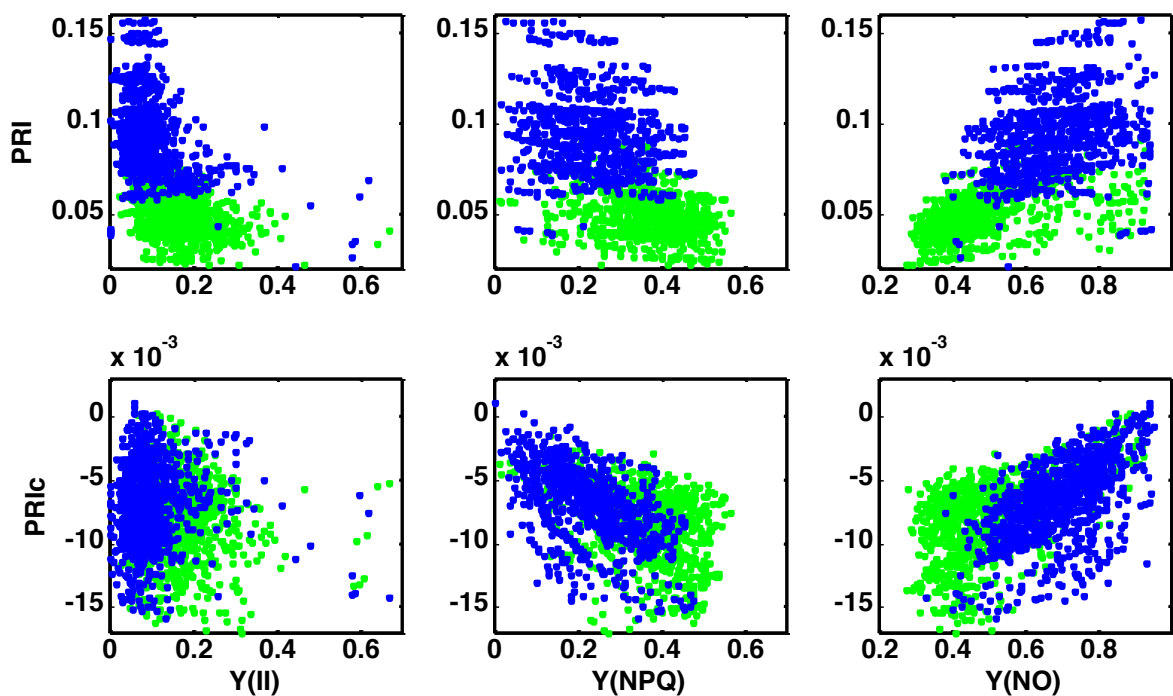


Fig. 6: Relationships between the quantum yield of photochemistry  $Y(II)$ , active non photochemical quenching  $Y(NPQ)$ , passive non-photochemical quenching  $Y(NO)$ , PRI and  $PRI_c$  (PRI corrected). Blue points are *Q. robur* species and green points are *Q. ilex* species.

## 5. Discussion

Different approaches have been developed to differentiate PRI variability unrelated to LUE to better interpret the PRI signal linked to photosynthesis activity. Wu et al. (2015) defined a structurally related signal in PRI as a function of the leaf area index (LAI) to improve accuracy in the estimation of LUE. Soudani et al. (2014), Hmimina et al. (2013, 2015) and Merlier et al. (2015) used the  $PRI_0$ , which corresponds to PRI values at very low light estimated from PRI vs. PAR relationships, to correct the PRI and assess its variability related to changes in the xanthophyll cycle. In this study, leaf-scale measurements of the biochemical and spectral properties,  $PRI_0$  and PRI responses to PAR variations and leaf chlorophyll fluorescence parameters were used to distinguish between phenological and physiological variability of the PRI under different stress conditions.

As shown in Fig. 3, the  $mNDI_{705}$  was used to estimate the leaf chlorophyll content, which was measured using two field-portable instruments (DUALEX and SPAD) and by the standard laboratory-based spectrophotometric method.

The  $PRI_0$  measurements are linked to the structural and biochemical properties of the leaves and explained by the chlorophyll content, which is indicated by the strong relationship between the  $mNDI_{705}$  and  $PRI_0$  (Fig. 4.a) for both species ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$ , Table 1). Similar results were previously reported at the canopy scale in Hmimina et al. (2013; 2015) and in Merlier et al. (2015). In this experiment, the  $mNDI_{705}$  is better correlated with the  $PRI_0$  than with the measured chlorophyll content because these two spectral indices are measured over the same leaf surface area, while the chlorophyll content concerns the whole leaf. The relationship between  $PRI_0$  and chlorophyll content is maintained significant in each treatment and for the two species during the entire experiment regardless of the phenological and physiological cycle. These results highlight the relevant use of  $PRI_0$  as a proxy of PRI variability linked to chlorophyll content.

The  $PRI_0$  is linked to the minimal fluorescence yield ( $F_0$ ), which is the state when all reaction centers are in an active “open” state ( $R^2=0.34$ ,  $p<0.01$  for both species together, Table 1).  $F_0$  is principally an emission of antenna chlorophyll-a pigments (McCauley et al. 1990), and it is related to the chlorophyll content that can be mobilized for photosynthesis. This relationship only occurs for *Q. robur*.  $F_m$  is the maximum fluorescence yield and appears when all of the reaction centers are in an inactive “close” form, and this value is also correlated with the  $PRI_0$  ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.05$  for both species together) and linked to the chlorophyll content. A relationship between  $PRI_0$  and  $F_m$  occurred for both species (*Q. Robur*,  $R^2=0.5$ ,  $p<0.05$  and *Q. Ilex*,  $R^2=0.07$ ,  $p>0.05$ ). “ $F_m-F_0$ ” is the more relevant fluorescence parameter linked to  $PRI_0$  ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$  for *Q. robur* and *Q. ilex* pooled;  $R^2=0.52$ ,  $p<0.001$  for *Q. robur*;  $R^2=0.1$ ,  $p<0.001$  for *Q. ilex*). These results highlight the relevant use of  $PRI_0$  as a proxy for the leaf fluorescence state on dark adapted leaves.

The impacts of ozone accumulation and atmospheric water deficit variations on the  $PRI_0$  at the leaf scale were investigated using a regression analysis. Ozone accumulation is expressed by AOT40, and atmospheric water deficit is expressed by EA. The  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  were significantly impacted the by ozone (AOT40) and atmospheric water deficit treatments (EA) for both the species (Table. 2). The  $PRI_0$  is correlated to the AOT40 and EA, and was used to assess changes in the chlorophyll pigment content caused by stress conditions for the two species (Table 2). The  $PRI_0$  decreased significantly for the two species in all treatments, including the ozone stress and atmospheric water deficit stress treatments as well as both stress successions, whereas it remained stable in the control plot. The  $PRI_0$  variability, therefore the leaf phenology, differed significantly between the treatments for the two species and was further impacted when the two stresses were combined. As summarized in Table 2, the  $PRI_0$  variability was significantly explained by the EA and AOT40. The slopes of the regressions between the  $PRI_0$  vs. EA or  $PRI_0$  vs. AOT40 were significantly different between the species and between the treatments, which highlights the different biochemical responses of the two

species to stress conditions and different biochemical responses of each species depending of the stress applied. According to Karlsson et al. (2007), *Q. ilex* is resistant to stress, especially ozone exposure, because of its larger leaf thickness, which is an important factor influencing the development of leaf injuries.

For *Q. robur*, the  $PAR_{sat}$  significantly varied under stress conditions and was correlated to the AOT40 and EA (Table 2). For *Q. ilex*, the  $PAR_{sat}$  was not correlated to the EA and AOT40, which is explained by the absence of significant variations of  $PAR_{sat}$  during this experiment and may have been caused by the resistance of this species to stress. The slopes of the relationships between  $PAR_{sat}$  vs. EA and  $PAR_{sat}$  vs. AOT40 were not significantly different between treatments in *Q. robur* (no relationship in *Q. ilex*). Compared with the slopes of the  $PRI_0$  vs. AOT40 and  $PRI_0$  vs. EA regressions, which varied between species and treatments, the slopes of the  $PAR_{sat}$  vs. AOT40 and  $PAR_{sat}$  vs. EA regressions remained constant. These results can be interpreted as a unambiguous response of  $PAR_{sat}$  to the stress conditions, including ozone exposure and atmospheric water deficits in this study, regardless of the species considered. Thus, the  $PAR_{sat}$  may be considered the physiological component of PRI variability, which it is independent of the phenological component related to the  $PRI_0$  or leaf biochemical properties, as previously reported in Merlier et al. (2015).

In this experiment, the order of succession of stress conditions had an effect on the leaf properties. The  $PRI_0$  of *Q. ilex* only varied when the atmospheric water deficit decreased prior to ozone injection (Fig. 5 and Table 2). After exposure to drought stress, the addition of oxidative stress induced by ozone caused additional stress to the plant. As reported in previous studies, water stress before ozone stress may result in a lower response to ozone exposure (Löw et al. 2006; Hayes et al. 2015) compared with ozone exposure without water stress. This result may be explained by the stomatal closure induced by drought stress, which can limit the absorption of ozone and its impact on leaves (Alonso et al., 2014). However, *Q. ilex* showed weaker physiological responses to water stress because it is a more drought-resistant species,



and more pronounced effects were observed when drought and ozone were combined, which is consistent with the results reported in Alonso et al. (2014).

Effects were not observed for plants undergoing atmospheric water deficit after the ozone exposure (Table 2). In our experiment, the application of an atmospheric water deficit occurred after the ozone exposure had reached an AOT40 of 1300 ppb, which may be insufficient to provoke additional effects on the leaf properties.

The PRI is a composite signal impacted by both the phenological (structural and biochemical) and physiological properties of leaves. Phenological effects may blur the physiological response of PRI linked to LUE. For species with high chlorophyll content variability, such as deciduous species, or during exposure to severe stresses, the PRI signal interpretation may lead to a misunderstanding of the PRI vs. LUE relationship, which was previously highlighted in Nichol et al. (2000) and Meroni et al. (2008). Thus, taking account of the phenological component is required to correct the PRI.

As shown in Fig. 7, the PRI is exponentially linked to the quantum yield of photosystem, Y(II), and this relationship is lost when the PRI is corrected after the subtraction of the  $PRI_0$ . This result can be explained by the importance of the phenological component in the PRI that is linked to the chlorophyll content (Hmimina et al. 2015; Merlier et al. 2015; Wu et al. 2015). As shown in previous studies, Y(II) is mainly under the control of chlorophyll content. Subtracting this phenological component leads to a diminishing of the relationship strength and induces an overall reduced physiological variability, especially under our conditions, wherein plants were adapted to the low light of the Ecolab cells and the leaves were considered shaded. Moreover, this negative exponential relationship appears to be an aggregation of several linear relationships controlled by biochemical properties (Fig. 6). The Y(NPQ) value expresses the quantum yield of NPQ linked to the xanthophyll cycle and has a better relationship with the  $PRI_c$  than with the PRI value ( $R^2=0.12$  and  $R^2=0.32$ , respectively). These results highlight the effectiveness of the PRI to track the xanthophyll cycle, especially when the phenological

component, which is xanthophyll independent, is subtracted. The use of this correction did not modify the link between the PRI and  $Y(NO)$  because this parameter depends on both the phenological and physiological leaf properties.

Many studies have shown that the PRI could be used to detect variations of chlorophyll content before visible symptoms occurs (Gerosa et al. 2009; Meroni et al. 2009; Panigada et al. 2012); however, the use of PRI to track LUE is more erratic and not as well understood. The high sensitivity of the  $PRI_0$  to structural and biochemical properties suggests that the relationship between the PRI and carbon assimilation of the canopy (LUE or GPP; Drolet et al. 2005; Goerner et al. 2009; Nakaji et al. 2014; Soudani et al. 2014), which have been observed in many previous studies and established over long time scale, may be caused by canopy structural and biochemical variations and not directly caused by the effects of abiotic factors on photosynthetic functioning.

Finally, the common methods of using the PRI, which do not exploit the close relationship between the PRI and PAR, may strongly limit the assessment of the physiological component of PRI. The approach developed here used the kinetics of PRI vs. PAR to obtain the  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  parameters and allowed for the separation of PRI's physiological and biochemical components. The physiological component of the PRI is highlighted by the relationships between  $PAR_{sat}$  and abiotic factors (atmospheric water deficit and ozone in this study). The biochemical component ( $PRI_0$ ) is linked to the chlorophyll content and the physiological component ( $PAR_{sat}$ ) is linked to the abiotic stress (ozone exposure and atmospheric water deficit in this study).

## 6. Conclusions

The present study investigated the responses of the PRI to abiotic stress conditions (atmospheric water deficit and ozone) for two species (*Q. robur* and *Q. ilex*) in climatic chambers. Measurements of the optical and fluorescence properties were coupled, and the PRI responses to PAR variations were characterized under contrasting plant stress conditions. Measurements of the  $PRI_0$ , PRI in dim light on dark adapted leaves, and  $PAR_{sat}$ , the value of PAR when the PRI saturates, were determined to study the biochemical and physiological sources of PRI variability.

The induced stress conditions led to different responses between the studied species. *Q. ilex* seems to be more resistant to ozone and water stress, and drought stress applied prior to the ozone injection had more important effects relative to the stresses that were applied independently. *Q. robur* is more sensitive to both stress factors, and significant variations in leaf biochemical and physiological characteristics were observed in all of the treatments.

The  $PRI_0$  is correlated with the leaf chlorophyll content that varied with chronic application of stress. For the same species, the relationship between the  $PRI_0$  and chlorophyll content is unambiguous, regardless of the stress factor. The use of the  $PRI_0$  to correct the PRI allows for the assessment of the PRI's physiological variability. Indeed, this correction increased the strength of the relationship between the  $PRI_c$  and the  $Y(NPQ)$ , which is linked to the xanthophyll cycle. The  $PAR_{sat}$  values also varied when stress was induced. The relationships between the  $PAR_{sat}$  vs.  $AOT_{40}$  or  $PAR_{sat}$  vs. EA did not vary with species or with stress intensity. These results highlight the ability of  $PAR_{sat}$  to track the physiological component of the PRI. Compared with the  $PRI_0$ ,  $PAR_{sat}$  appears not species-dependent.

## **CHAPITRE IV**

# **PRI responses to climatic drought conditions in a mature deciduous forest**



# PRI responses to climatic drought conditions in a mature deciduous forest

---

## 1. Abstract

The use of remote sensing to understand ecosystem functioning allows studies at large spatial and temporal scales. The photochemical reflectance index has the potential to estimate the light use efficiency but confounding factors, as canopy structure and leaf biochemistry, blur its interpretation at canopy scale. In this study, the variability of PRI of a mature forest composed by pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl) and a dense understory of coppiced hornbeam (*Carpinus betulus* L.) located in Barbeau-Fontainebleau, are measured at high temporal resolution (from 100 ms to 5 seconds depending on light environment) and analyzed in a context of drought period in summer 2015. The daily PRI vs. PAR (photosynthetically active radiation) relationships are used to estimate parameters derived from PRI to deconvolute the physiological PRI variability related to LUE, from the phenological variability related to canopy structure and leaf biochemistry. The value of PAR at PRI saturation ( $PAR_{sat}$ ) was highly correlated with the soil water content ( $R^2=0.57$ ,  $p<0.001$  at 120-150 cm of depth), highlighting the capacity of PRI to track the physiological variability of canopy. The estimated value of PRI in darkness ( $PRI_0$ ), which is the intercept of the relationship of PRI vs. PAR, was highly correlated to  $mNDI_{705}$  ( $R^2=0.74$ ,  $p<0.001$ ) highlighting the capacity of this parameter to be a proxy of the canopy biochemical variability. The daily value of  $PRI_0$  was subtracted from PRI values to isolate the phenological variability of PRI and access the PRI variability linked to LUE. This corrected PRI ( $PRI_c$ ) improved the correlation between PRI and LUE ( $R^2=0.48$ ,  $p<0.001$  with PRI and  $R^2=0.52$ ,  $p<0.001$  with  $PRI_c$ ), which highlight the involvement of phenological component in

the PRI even during a period during when the biochemistry variability is weak. However, the climatic drought period induced a different relationship between PRI and LUE. Further studies are required to validate the capacity of PRI to be a proxy of the canopy functioning in case of drought.

## **2. Introduction**

Forest ecosystems represent an important carbon sink (Running et al., 2007) but they are particularly subjected to climatic constraints that can modify their physiological and phenological responses counterbalancing this role. Soil water is the main limiting factor of productivity over wide areas. Even when the effects of soil water deficit are not pronounced and the damages caused on the leaves are not visible, the biochemical and physiological properties of leaves are impacted. Regardless of abiotic causes of plant stress, the photosynthesis rate decreases and the absorbed light energy rapidly exceeds the capacity of its utilization by the photosystems (Ort, 2001). To prevent to the formation of reactive oxygen species under light excess, carotenoids and specially xanthophylls play an important role and are directly involved in the mechanisms of dissipation of the excess energy and protection against photo-oxidative stress (Szabo et al. 2005; Yamamoto, 1979; 2006, Pfundel and Bilger, 1994, Demmig-Adams & Adams, 1996; Jahns and Holzwarth, 2012).

The LUE, which is the ratio of the amount of carbon assimilated on the rate of absorbed photosynthetically active radiation (PAR), allows the estimation of the photosynthesis rate and is commonly measured at the canopy scale using Eddy-Covariance method with the data acquired with flux-tower. While the upscaling of flux-tower derived data improved the prediction of carbon fluxes, the evaluation of ecosystem responses to abiotic stress remains a major challenge (Gebremichael & Barros 2006, Jung et al. 2009, Anav et al. 2010). Moreover flux tower based monitoring of ecosystems cannot be extrapolated to larger scales due to ecosystem heterogeneity.

Remote sensing offers an important landscape and regional perspectives to study vegetation structure and function (Asner et al., 1998). Remote sensing of vegetation is used to derive indices of vegetation cover, such as the normalised difference vegetation index (NDVI) (Tucker, 1979),  $mNDI_{705}$  (Sims and Gamon, 2002), which have the potential to monitor the temporal change of the forest canopy structure and biochemistry respectively, especially in case of stress leading to significant variations in the amount of leaf biomass or chlorophyll content. However these indices fail to capture physiological processes occurring on fine temporal scale, as changes in LUE not accompanied with significant changes in canopy structure and biochemistry.

Gamon et al. (1992; 1997) developed the photochemical reflectance index (PRI) from the narrow-band reflectance at 531 nm, which is correlated to the de-epoxydation state of the xanthophyll pigment pool - thus to changes in non-photochemical quenching (NPQ) -, and a reference band at 570 nm, which is insensitive to variations in the concentrations of xanthophylls. The PRI has been shown to be able to track changes in the xanthophyll cycle pigment content at the leaf scale for many herbaceous and woody species (Gamon et al., 1990; Fillela et al., 1996; Gamon and Surfus, 1999; Sims et Gamon, 2002; Peguero-Pina et al., 2008) and is used to track the changes in light use efficiency in the photosynthesis process at leaf and canopy scales, providing a widely applicable spectral indice of LUE over a wide range of species, functional types and nutrient levels (Peñuelas et al., 1995; Fillela et al., 1996; Gamon et al., 1992; 1997; Garbulsky et al., 2011). However, at forest canopy scale, studies reported contrasting results highlighting the implication of canopy structure, sun-view geometry and biochemical properties of leaves in the signal, leading to difficulties in its interpretation and its use as proxy for canopy-scale photosynthesis (Barton et al., 2001; Hall et al., 2008; Hilker et al. 2009; Goerner et al., 2009). At canopy scale, recent studies (Hmimina et al., 2013; 2015; Wong & Gamon, 2015; Soudani et al. 2014; Merlier et al. 2015) concluded that the PRI is a complex composite signal and relationships between PRI and LUE



need to be interpreted carefully in order to separate what is actually directly related to the response of photosynthesis to abiotic conditions, which is highly variable instantaneously, from which is due to sun-view geometry, phenological and biochemical causes that occur on longer time scales from days to seasons. Indeed, the wavelength around 530 nm is sensitive to other bulk pigment content (Filella et al., 2009; Stylinisky et al., 2002) and to within canopy light conditions. Hall et al. (2008) and Hilker et al. (2009) highlight this strong dependency and established two distinct relationships between PRI and LUE for sunlit and shaded foliage surfaces.

From these studies, several methods allowing the deconvolution of PRI sources of variability were developed in order to separate physiological related-sources from other sources, mainly related to angular, structural and biochemical effects that may blur the interpretation of PRI vs LUE relationships. PRI variability due to sun angular effects are studied based on exhaustive experimental approach in Hilker et al. (2011) and also using radiative transfer modelling in Barton et al. (2001) but in this last approach, variations of PRI are only considered from a physical point of view and physiological-related sources of reflectance at PRI wavelengths are not taken into account. Sources of PRI related to variations of canopy biochemical and structural properties were deeply studied in recent studies and particularly in Gamon and Berry (2012); Hmimina et al. (2013; 2015) and in Merlier et al. (2015). However, as the xanthophyll cycle responds to PAR changes at very short time scale of order of minutes (Jahns & Holzwarth, 2012) depending on light conditions, the LUE and the photosynthesis rate exhibit a high spatial and temporal variability (Falge et al., 2002; Le Quere et al., 2009). This fine time scale variability must be taken into account in the use of the PRI as proxy of LUE (Hmimina et al., 2015) to avoid the confounding factors that can mask the low variability due to LUE in measurements. Moreover, as photosynthesis is known to be sensitive to the ratio between direct and diffuse radiation (Alton et al., 2007; Urban et al., 2007; Brodersen et al., 2008), the vertical distribution of radiation within the canopy,

between sunlit and shaded leaves, can induce discrepancies between PRI and LUE relationships depending of canopy structure and sky conditions. To isolate the phenological variability of PRI, Hmimina et al. (2013; 2015) and Merlier et al. (2015) used the  $PRI_0$ , the estimation of the value of PRI at dim light and showed its relationship with the canopy chlorophyll content. This relationship was also highlighted in Merlier et al. (*submitted*). The  $PAR_{sat}$ , a second parameter derived from PRI vs. PAR relationship, represents the value of PAR when PRI saturates, and was showed to be linked to factors limiting photosynthesis, as the chlorophyll content during budburst and senescence phases and the soil moisture content during the growing season (Merlier et al., 2015).

In this study, we investigated the relationships between PRI and LUE from continuous *in situ* measurements of PRI at high temporal resolution acquired at the minute scale simultaneously to eddy-covariance based measurements of net CO<sub>2</sub> exchanges acquired on a half-hourly basis, in a deciduous mature forest in France in a context of climatic drought that occurred during summer 2015. The main objectives are: (1) investigating the temporal variations of PRI and LUE; (2) linking the PRI variations to influencing meteorological and eco-physiological variables; and (3) evaluating the performance of PRI as a proxy of the ecosystem LUE under climatic drought conditions.

### **3. Material and methods**

This study took place in a mature temperate deciduous forest located in Fontainebleau-Barbeau forest (48°28'35"N/2°46'48"E), in the southeast of Paris (FLUXNET site code: FR-Fon; <http://www.barbeau.u-psud.fr/>, [www.fluxnet.ornl.gov](http://www.fluxnet.ornl.gov)). This forest is representative of the main deciduous broadleaf forest type in Europe and is occupied by two overstory species: pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl) and a dense understory of coppiced hornbeam (*Carpinus betulus* L.). The age of the overstory is 150 years, and the average height is approximately 25 m.

Meteorological variables were recorded along with water and carbon fluxes, which were assessed using the eddy-covariance technique. The meteorological data available were those usually measured over flux tower sites. The net carbon exchange (NEE), the evapotranspiration (ETR) and other climatic variables as wind speed, incident, reflected and transmitted radiation, VPD (vapour pressure deficit), precipitation, air temperature, ozone concentration, sap flux etc. were recorded half hourly. The soil water content was measured each hour for different depths until 150 cm.

The gross primary production was calculated using the CARBOEUROPE database standards (Delpierre et al., 2012):

$$GPP = NEE + ER \text{ (Eq.1)}$$

where *NEE* is the net ecosystem exchange and *ER* is the ecosystem respiration.

The absorbed PAR (Photosynthetically active radiation) expressed as aPAR was calculated as Soudani et al. (2014):

$$aPAR = iPAR - rPAR - tPAR \text{ (Eq.2)}$$

where *iPAR* represents the incident radiations and *rPAR* represents the reflected radiation measured above the canopy, and *tPAR* represents the transmitted radiations measured below the canopy. In this study and because of the high variability of beneath canopy radiation, tPAR is an average of measurements acquired by fifteen sensors installed in about 30 m around the Fontainebleau-Barbeau flux tower.

The light use efficiency was calculated as:

$$LUE = \frac{GPP}{aPAR} \text{ (Eq.3)}$$

Measurements of PRI and NDVI were acquired continuously at 30 min time step using two optical sensors fixed above the canopy since 2006 for the PRI and since 2005 for the NDVI (Soudani et al.2014). For the PRI measurements, the model SKR 1800 manufactured by SkyeInstruments (Skyeinstruments Ltd., Llandrindod Wells, UK) was used and already

validated in previous studies (Soudani et al., 2014). For NDVI measurements, data are acquired using laboratory-made NDVI sensor following the description given in Pontailier et al. (2003) and Soudani et al. (2012) and was already used and validated in Soudani et al. (2012; 2014). In addition to these optical measurements, spectral measurements were made from May to August 2015, using 2 spectrometers (LR1-T, 300-1000 nm, 0.66 nm resolution, ASEQ instruments, Vancouver, Canada). The first spectrometer was used to measure incident radiation collected with a cosine corrector (CCSA1, Thorlab, Newton, NJ, USA) and the second one was used to measure radiation reflected by the canopy, collected within 25° field of view. Both sensors are mounted at 7 m from the top of the canopy. The area covered by downward looking sensor was about 8 m<sup>2</sup>. This sensor was installed on a boom facing south and looking at nadir. Both spectrometers are synchronized, and their integration times are continually adjusted in order to maximize their signal versus noise ratio, resulting in a temporal resolution that varies between 100 ms and 5 seconds depending on light environment. All measurements, from spectrometers and from PRI and NDVI sensors, are acquired over the same leaf area at the top of canopy.

In this study, PRI and mNDI are derived from measurements acquired by spectrometers because of their high temporal resolution and calculated as follows:

$$PRI = \frac{R_{[525-535]} - R_{[565-575]}}{R_{[525-535]} + R_{[565-575]}} \quad (\text{Eq.4})$$

$$mNDI_{705} = \frac{\rho_{750} - \rho_{705}}{\rho_{750} + \rho_{705} - 2 \times \rho_{445}} \quad (\text{Eq.5})$$

As underlined above, NDVI measurements are available over a long period than measurements acquired by the two spectrometers and they are used in this study. NDVI is computed from radiances as follows (Soudani et al. 2012):

$$NDVI = \frac{R_{[640-660]} - R_{[780-920]}}{R_{[640-660]} + R_{[780-920]}} \quad (\text{Eq.6})$$

where  $R_{445}$ ,  $R_{531}$ ,  $R_{570}$ ,  $R_{705}$  et  $R_{750}$  are the radiances integrated over a 10 nm wide band centered on wavelengths 445, 531, 570, 705 et 750 respectively.

The values of incident PAR were calculated using spectra of incident radiation acquired from the spectrometer and integrated over 400-700 nm wavelength bandwidth.

The PRI responses to PAR variations measured simultaneously to the PRI at the intra-daily scale, were analyzed using a non-linear regression following the expression given in Hmimina et al. (2015):

$$PRI(t) = PRI_{0,j} + \Delta PRI_j * erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat,j}}\right) \quad (\text{Eq.7})$$

$$\text{with } erf\left(\frac{PAR(t)}{PAR_{sat,j}}\right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{PAR(t)}{PAR_{sat,j}}} exp^{-x^2} dx$$

where  $PRI_{0,j}$ ,  $PAR_{sat,j}$  and  $\Delta PRI_j$  are three parameters estimated using mean square minimization for the day (j) and Erf is the error function.

$PRI_{0,j}$  estimated is the intercept of the relationship between PRI and incident PAR at the canopy scale to express the link between PRI and structural and biochemical canopy properties.

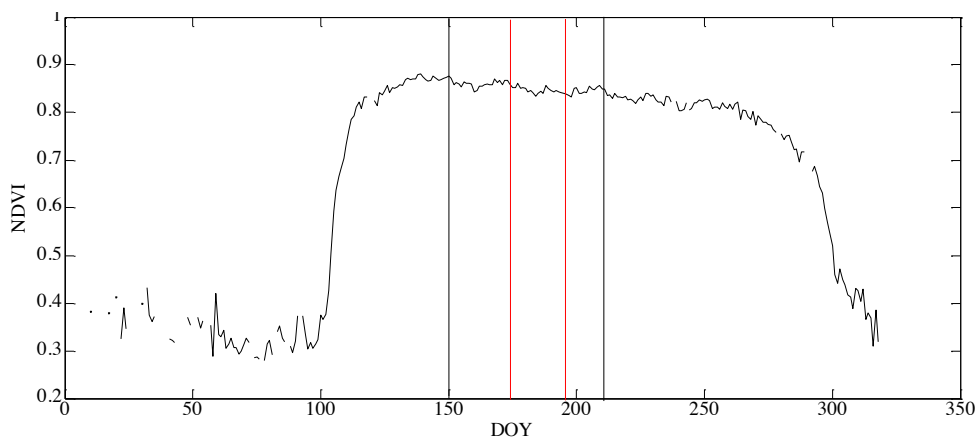
The  $PAR_{sat,j}$  corresponds to the PAR value when the PRI to PAR response shows saturation. This parameter is defined by similarity to the light saturation asymptote in the photosynthesis light response curve of photosynthesis. Thus, in our experimental conditions, it is expected that this parameter ( $PAR_{sat}$ ) should be sensitive to leaf chlorophyll content and abiotic factors particularly soil water conditions because the maximum photosynthetic capacity is strongly limited by these two variables.

The parameter  $\Delta PRI_j$  expresses the range of canopy PRI variations at the intra-daily scale. Thus,  $\Delta PRI$  reflects the temporal dynamic of PRI at a daily scale in response to light

conditions. As discussed in the introduction, over short time scales, PRI is sensitive to the xanthophyll cycle; therefore, we assume that  $\Delta PRI_t$  may reflect temporal concentration variations of different pigments involved in this cycle.

## 4. Results

The Fig. 1 illustrates the temporal variability of NDVI acquired half-hourly by NDVI sensor in the Fontainebleau-Barbeau forest for the year 2015. The NDVI variability indicates the seasonal variations of canopy structure and expresses the typical pattern of deciduous forests. The dormancy season, which began the year 2014, lasted until the DOY 98 (day of year), and was followed by budburst and the leafy season. The NDVI reached a plateau at DOY 116 corresponding to the growing season with full expanded leaves. In 2015, the drought period induced a tree growth cessation, which started in June 23<sup>rd</sup> (DOY 174), lasted 22 days and ended in July 15<sup>th</sup> at DOY 196 (Fig. 2). To study the effects of climatic drought on PRI, the following results focused on this period and few weeks around. The period studied is from DOY 150 to DOY 210.



*Fig. 1: Seasonal variations in 2015 of NDVI measured every half-hour above the deciduous forest canopy of Fontainebleau-Barbeau flux-tower site. The data were acquired between 8 h and 18 h TU. The tree growth cessation occurred between red lines (DOY 174 to DOY 196), and the studied period is between black lines (DOY 150 to DOY 210).*

The Fig. 2 illustrates the temporal dynamics of temperature, vapour pressure deficit (VPD), incident photosynthetically active radiation (PAR), soil water content (SWC), precipitations, evapotranspiration (ETR), mean tree growth, gross primary production (GPP), light use efficiency (LUE) and PRI. The temperatures were significantly higher during the climatic drought period than before and after it ( $21.9\pm 0.34^{\circ}\text{C}$  during the climatic drought vs.  $16.94\pm 0.25$  and  $20.2\pm 0.33$  before and after the drought respectively). The VPD dynamic showed a sharp and significant increase at DOY 174 and remained important during the drought period with a mean of  $1.28\pm 0.05$  kPa (with a mean of  $0.71\pm 0.03$  kPa for the period before the DOY 174 and  $0.89\pm 0.05$  kPa for the period after the DOY 196). The variability of PAR before and during the drought showed different patterns. Before the drought, the incident PAR variability showed strong temporal variations, related to sky conditions, whereas there was less variability during the drought, after DOY 174 as shown in Fig. 2. The values of PAR were also calculated using the incident PAR measured by spectrometer and were validated with the incident PAR measured with the sensor ( $R^2=0.80$ ,  $p<0.001$  with a slope of 1 and an offset of 83.9). Concerning the precipitation, there was 5.29 mm at DOY 172, then few precipitations occurred at DOY 184 and 185 (0.20 mm for both days). Finally, after the dry phase, the precipitations were more abundant with 7.33 mm and 11.60 mm during DOY 198 and DOY 199 respectively and 2.64 mm at DOY 206. The SWC constantly decreased, with a small increase at the end of the drought (after the rain at DOY 198). The evapotranspiration (ETR) increased at the beginning of climatic drought period and remained high until DOY 183 then decreased during DOY 185 and increased again after the short rainy and cloudy period. Concerning the tree growth, both oak and hornbeam showed an interruption at DOY 174. This day is considered as the beginning of the drought period. The average cumulative growth of circumference at breast high of hornbeam species remained constant at 3 mm until DOY 196, whereas it remained constant at 6.5 mm for oak, with a very

weak increase at DOY 184 probably corresponding to a trunk dilatation not to real tree growth. The tree growth started again at DOY 198.

The GPP followed a decreasing trend with a strong inter-daily variability during the whole studied period. The LUE decreased at the beginning of the climatic drought period and increased at DOY 184 and DOY 185, when few precipitations occurred, then declined until the DOY 196, marking the end of the drought. The dynamic of PRI from DOY 170 to 210 showed a decrease at DOY 174, an increase from DOY 180 to 185, then a decrease until DOY 195 and a new increase. The PRI was significantly lower during the tree growth cessation with a mean of  $0.1937 \pm 0.0069$  vs. a mean of  $0.2142 \pm 0.0070$  before and  $0.2251 \pm 0.0058$  after the drought. An increase of PRI occurred at DOY 184-185 during the short rainy and cloudy period then it dropped for the second week of drought. An increase of PRI occurred at the end of drought linked to precipitations (DOY 196).

The Fig. 3 shows the boxplot of PRI grouped by week. The first two weeks correspond to the period before the drought, the two weeks that started from DOY 175 correspond to the two weeks of drought, during the period of discontinuation of the tree growth, and the two lasted weeks are the resumption of growth, linked to the end of the drought. The notches of the boxplot, which represent the confident intervals at the 5% of significance level, show that PRI decreased significantly during the week beginning at DOY 175. The PRI of the other weeks remained in the same confident interval except for the week of the DOY 196 where it was higher.



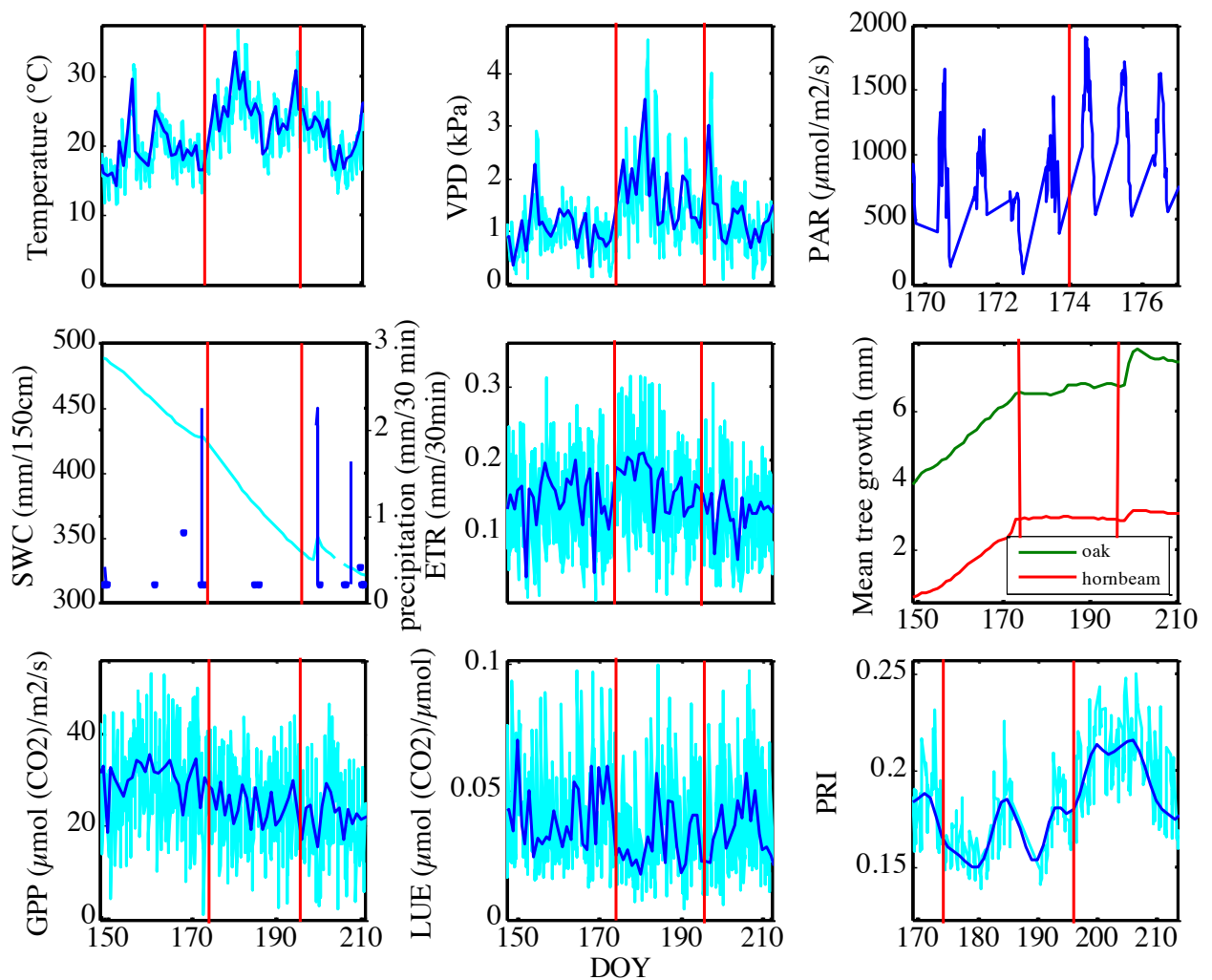


Fig. 2: Variations of temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), vapour pressure deficit (VPD, kPa), photosynthetically active radiation (PAR,  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), soil water content (SWC in mm for 150 cm of soil depth, left axis) and precipitation (mm/30 min, right axis), evapotranspiration (ETR, mm/30min), mean tree growth (mm), gross primary production (GPP in  $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{m}^2/\text{s}$ ), light use efficiency (LUE in  $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\mu\text{mol}$  of PAR) and PRI. Measurements are acquired every half-hour above the canopy from DOY 150 to DOY 210, and every minute for the PRI. The data presented were acquired between 8 h and 18 h TU. Data measured are in light blue and the means are in dark blue, the red lines mark out the period between DOY 174 and DOY 196.

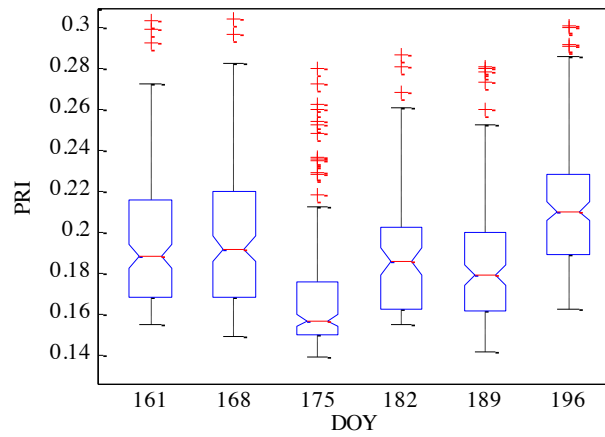


Fig. 3: Boxplot of PRI for six weeks, from DOY 161 to DOY 203. The central red line is the median, the blue edges of the box are the 25th and 75th percentiles, the whiskers extend to the data points not considered outliers (in black), outliers are plotted individually (in red).

As shown in Fig. 4, a similar dynamic was observable between  $mNDI_{705}$  and  $PRI_0$ . During 4 days, from DOY 186 to DOY 190, there was malfunction of the acquisition system by sepectrometers. The  $mNDI_{705}$ , proxy of canopy chlorophyll content, decreased few days before the tree growth cessation (DOY 170). This decrease occurred also for  $PRI_0$ , but seems to start earlier. A small rise appears around DOY 185, coinciding with the occurrence of short-term and weak rains. At DOY 190, the  $PRI_0$  increased until DOY 205 then decreased again after DOY 210. A similar trend occurred for  $mNDI_{705}$ , except the increase of DOY 190, which was less linearly. A decreasing trend appeared for the  $PAR_{sat}$  with an increase the DOY 172 two days before the tree growth cessation (DOY 174) and the days of weak rains (DOY 184-185). At DOY 192, after more abundant rains (7.33 mm) marking the end of drought period, the  $PAR_{sat}$  values stabilized and then increased with the occurrences of rains.

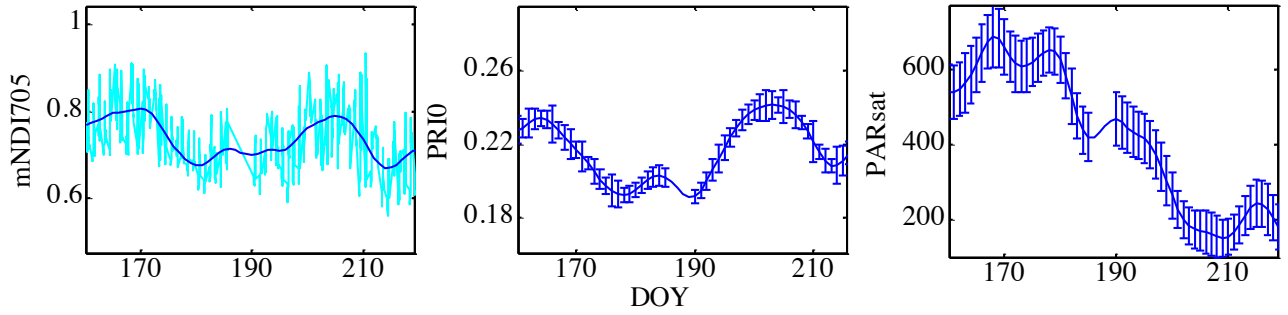


Fig. 4: Dynamics of  $mNDI_{705}$ ,  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  calculated from measurements acquired above the canopy. For  $mNDI_{705}$ , data measured with the spectrophotometer are in light blue and the means are in dark blue.

The  $PRI_0$  was correlated with  $mNDI_{705}$  ( $R^2=0.74$   $p<0.001$ ) and this result is in agreement with the previous studies (Hmimina et al., 2015; Merlier et al., 2015). The  $PAR_{sat}$  was correlated to soil moisture content and the correlations increased with the soil depth as shown in Table 1.

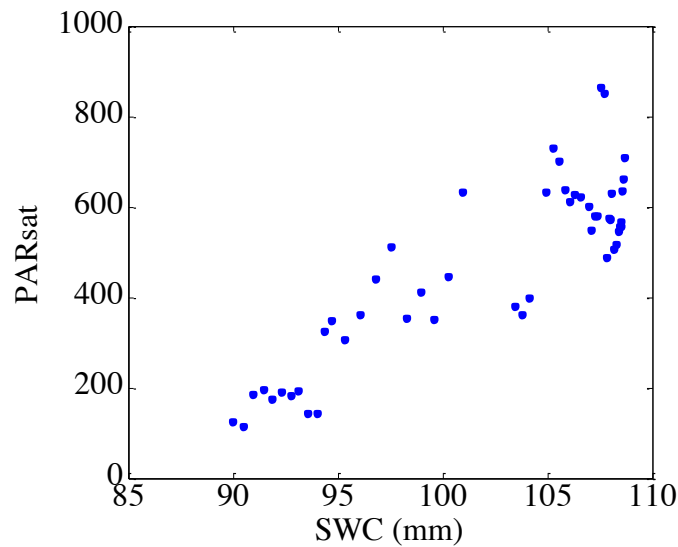


Fig. 5: Relationship between  $SWC$  (mm) and  $PAR_{sat}$  from the DOY 150 to 210.

		Soil water content (mm)					
		0-30cm	30-60cm	60-90cm	90-120cm	120-150cm	0-150cm
$PAR_{sat}$	$R^2$	0.33	0.41	0.60	0.69	0.76	0.59
	pvalue	**	***	***	***	***	***

Table 1: Summary of the regression between Soil water content (SWC in mm) and  $PAR_{sat}$  for the period between DOY 150 and DOY 210 ( $R^2$ ; \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively).

A significant relationship between PRI and LUE for the period between DOY 150 and 210 is shown in Fig. 6a ( $R^2=0.43$ ,  $p < 0.001$ ). The relationship increased using the corrected PRI ( $PRI_c$ ) ( $R^2=0.48$ ,  $p < 0.001$ ).  $PRI_c$  being obtained after subtracting the  $PRI_0$  from the values of PRI (Fig. 6b). When the  $PRI_c$  is calculated only during the tree growth cessation, the relationship between  $PRI_c$  and LUE was stronger ( $R^2=0.52$ ,  $p < 0.001$ ). A good relationship still appeared during the drought period ( $R^2=0.44$ ,  $p < 0.001$ ), with a shift along the  $PRI_c$  axis.

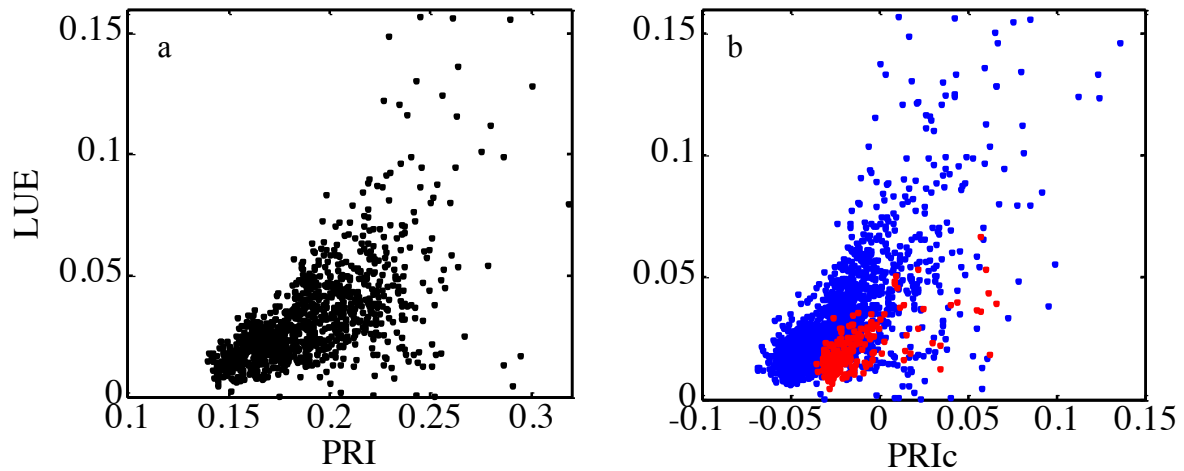


Fig. 6: (a) Relationship between PRI and LUE (LUE in  $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)/\mu\text{mol}$ ) from the DOY 150 to 210 and (b) the relationship between  $PRI_c$  and LUE ( $PRI_c$  calculated during the tree growth cessation are in red and the  $PRI_c$  for the period before and after the drought are in blue).

## 5. Discussion

The year 2015 was marked by a climatic drought period that caused a tree growth discontinuation in the Fontainebleau-Barbeau forest. The growth cessation lasted 22 days and impacted both species, hornbeam and oaks (pedunculate and sessile), from DOY 174 to DOY 196. During this period, the temperatures and particularly the VPD (vapour pressure deficit) were significantly higher. The SWC (soil water content) constantly decreased during the studied period with the exception of a small increase after the weak rain that occurred at DOY 184 and DOY 185 (Fig. 2). The effects of the climatic drought were particularly evident on the LUE which decreased and remained significantly low throughout the whole period. The effects of drought on CO<sub>2</sub> exchanges are less visible on the GPP as this variable is mainly controlled by the solar radiation. The LUE informs better on the effects of drought as this variable is standardized and expressed per unit of absorbed solar radiation.

The decline of PRI was particularly marked during the first week of drought (DOY 175-181, Fig. 4). The decreasing trend of PRI in dry conditions may be related to the increase of the incident radiation linked to a clear sky during drought periods. Indeed, PRI is highly dependent on the incident radiation and decreases when the PAR increases. This decrease is linked to the decrease in reflectance at 531 nm due to photoprotective pigment and the necessity to dissipate the incident radiation to protect the photosystems (Gamon et al., 1997; Hmimina et al. 2013). The decreasing trend of PRI may also be explained by decline of mNDI<sub>705</sub>, linked to canopy chlorophyll content (Hmimina et al., 2015; Merlier et al., 2015), during the drought, or by changes in canopy structure (as leaf orientation). These are only assumptions that need to be verified.

The PRI is a composite signal including different sources of variability depending on the considered time scale, and has the same seasonal pattern as mNDI<sub>705</sub>. To separate between phenological and physiological components of PRI, the parameters of Eq.6 were estimated. The PRI<sub>0</sub>, the PRI parameter linked to canopy biochemistry, has a similar pattern than

mNDI<sub>705</sub> (Fig. 4), highlighting the strong involvement of the canopy structure and the biochemistry in the PRI signal. The PRI<sub>0</sub> increased at the beginning of the second week of drought, while few precipitations occurred at DOY 184, which can be linked to a rapid mobilisation of chlorophyll content in response to more favourable weather conditions for photosynthesis. This rapid mobilization of chlorophyll may also explain the increase of the LUE during the second week of drought and growth cessation.

The PAR<sub>sat</sub> showed a decreasing trend during the climatic drought period (Fig. 4) and was highly correlated with the SWC (Fig. 5, Table 1). This result is also in agreement with the previous studies of Hmimina et al. (2015) and Merlier et al. (2015) who showed highly significant positive relationships between PAR<sub>sat</sub> and soil moisture content over small canopies of young trees of beech, oak and Scots pine. In drought conditions, the limiting factor for photosynthesis was the water availability. Being highly correlated to the availability of water, the PAR<sub>sat</sub> was the parameter that provided information on the canopy physiology. This parameter expressed the physiological component of PRI and its variability was directly affected by the availability of water in the soil, and more particularly the SWC at the lower soil horizons (Table 1).

The relationship between PRI and LUE was negative as also reported in Hmimina et al. (2013; 2015) at leaf and canopy scales. The sign of this relationship varies depending on the manner of calculating the PRI, which can result in a negative relationship (Nakaji et al., 2006; 2007; Wu et al., 2010; Garbulsky et al., 2011; Soudani et al., 2014). Although significant, the relationship between PRI and LUE was improved after subtracting the PRI<sub>0</sub>, linked to pigment content, from the PRI (Fig. 6b). The high correlations also obtained between PRI and LUE before removing the PRI<sub>0</sub> variability may be due to small changes in biochemical composition during the time period considered.

However, the climatic drought period caused a different relationship between PRI<sub>c</sub> and LUE as shown in Fig. 6. The PRI<sub>c</sub> values during the tree growth cessation were higher for the

same LUE values. During drought, the amount of incident radiation was higher and the soil moisture was lower, inducing a quick saturation of PRI. Almost all PRI values were saturated during these days, inducing a weak intra-day variability of PRI under drought conditions. In these conditions, the LUE was low and its intra and inter-daily variability was weak. From statistical point of view, these conditions do not allow to assess the strength of PRI vs. LUE relationships because of their low variabilities. Moreover, the  $PRI_0$  was low during the drought periods and the correction of PRI has a lesser effect. Furthermore, like many other reflectance-based vegetation indices, PRI may provide only information about the upper part of the canopy whereas LUE, which expresses the GPP per unit of absorbed solar radiation, may contain the contribution of the lower strata of leaves even though this contribution remains low due to the rapid extinction of radiation within the canopy. These different sensitivities of these two variables to canopy structure may also explain the differences between  $PRI_c$  vs LUE relationships during and outside the period of drought. What are the contributions of the different leaf canopy strata to LUE estimated at the ecosystem scale from eddy-covariance flux measurements and how these contributions vary according to the amount and the quality of the absorbed radiation (diffuse to direct solar radiation ratio) is an important issue because the answers to these questions may help to better understanding of causes of the variability of the  $PRI_c$  vs. LUE relationships within the same forest ecosystem and between ecosystems.

## **6. Conclusion**

This study aims to assess the sources of PRI variability at canopy scale in a mature deciduous forest stand located in Fontainebleau-Barbeau forest which experienced a period of climatic drought during the summer 2015.

A significant decrease of light use efficiency and PRI were observed during the period of drought that lasts about 22 days. The PRI was driven by confounding factors and has the

same seasonal pattern as  $mNDI_{705}$ . The  $PRI_0$  was estimated as the structural component of PRI, and its high correlation with the  $mNDI_{705}$  allowed isolating the biochemical/structural-related PRI variability. This study also highlights the strong dependency of  $PAR_{sat}$ , which is the value of PAR at PRI saturation, and the soil water content.

The relationship between PRI and LUE was linearly, positive and significant. However the use  $PRI_0$  to correct PRI values allowed to obtain  $PRI_c$  that was more correlated to LUE. Relationships between  $PRI_c$  vs. LUE seem to be different depending on the period considered.

These results confirm the relevance of the approach developed in the previous studies concerning the PRI vs. PAR relationship to deconvolute the PRI variability and validates its application to a mature forest in natural conditions that experienced climate drought conditions.





## **CHAPITRE V**

### **Discussion Générale et conclusion**



## Discussion Générale et conclusion

---

Le PRI est un indice optique développé dans les années 1990 par Gamon et al. (1990), sur la base de mécanismes observés à l'échelle de la feuille. Il permet d'accéder à l'état de dé-époxydation du cycle des xanthophylles qui sont des pigments protecteurs des feuilles. La mise en place du cycle permet de switcher la distribution de l'énergie lumineuse de son utilisation par les photosystèmes vers de la dissipation thermique afin d'éviter les dommages encourus par l'accumulation d'un excès d'énergie. Le cycle des xanthophylles est bien connu (Yamamoto, 2006 ; Demmig Adams, 1989), et le potentiel offert par la télédétection permet d'approximer l'état de ce cycle grâce au PRI. Suivant le niveau de conversion de la violaxanthine, l'absorbance et la réflectance de la lumière par la feuille varient dans les longueurs d'onde autour de 505 nm et 530 nm respectivement (Gamon et al., 1992 ; 1997; Govindjee et al., 2004). Suivre l'état de dé-époxydation des xanthophylles permet donc indirectement d'accéder à la gestion de l'énergie lumineuse absorbée et à la photosynthèse de la feuille. Ainsi de nombreuses études se sont penchées sur l'utilisation de cet indice prometteur (voir la review de Garbulsky et al., 2011). Il en résulte des conclusions contradictoires sur l'emploi du PRI comme proxy de la LUE. En effet, le PRI est sensible à des facteurs confondants tels que la biochimie de la canopée (Moran et al. 2000, Stylinski et al. 2002; Nakaji et al. 2006; Filella et al. 2009) et sa structure (Hilker et al. 2008 ; Soudani et al. 2014 ; Merlier et al. 2015). Ces facteurs confondants viennent masquer la variabilité physiologique d'intérêt, notamment lors de son utilisation à des échelles temporelles et spatiales larges, en raison de la variabilité biochimique et structurale qui en résultent. Ces facteurs confondants nuisent à la généralisation de l'usage du PRI lors des transferts d'échelle et sont un frein à son utilisation. Bien que les causes de variabilité observées dans les relations PRI vs. LUE entre sites soient connues, peu de travaux ont entrepris la démarche de mieux comprendre les facteurs qui jouent sur cet indice aux différentes échelles, en lien avec les

variations abiotiques de l'environnement, dans le but d'isoler clairement les différents facteurs de variabilité et de permettre ainsi une généralisation de son utilisation quelque soit l'échelle considérée.

Le travail réalisé ici s'inscrit dans ce contexte et cherche à évaluer l'apport du PRI en tant que proxy de l'activité photosynthétique notamment en cas de contraintes environnementales aux différentes échelles spatiales (feuille, mini-couvert, peuplement) et temporelles (de la seconde à l'année). L'organisation de cette discussion permet de replacer dans un contexte général les résultats obtenus à l'aide des différentes approches développées.

## **1. La réponse du PRI au PAR peut être décrite par trois paramètres**

L'analyse des relations de forme exponentielle négative entre le PRI et le PAR (rayonnement photosynthétiquement actif) permet de résumer la réponse du PRI à l'énergie lumineuse en trois paramètres. Le  $PRI_0$  est défini comme le PRI d'une feuille ou d'un couvert adapté à l'obscurité tandis que le  $PAR_{sat}$  est la valeur de PAR à partir de laquelle le PRI sature dans cette relation. Le  $\Delta PRI$  est quant à lui la variation entre le  $PRI_0$  et la valeur de PRI maximum à saturation.

### **1.1. La variabilité phénologique du PRI : le $PRI_0$**

Le  $PRI_0$  a été estimé en utilisant l'ordonnée à l'origine de la relation PRI vs. PAR (Chap.II et Chap.IV) et mesuré sur des feuilles adaptées à l'obscurité à très faible lumière afin de ne pas activer le cycle des xanthophylles (Chap.III). L'approche concernant le suivi des mini-couverts a mis en évidence la forte corrélation entre  $PRI_0$  estimé et  $mNDI_{705}$  à l'échelle de la canopée, toutes espèces et traitements confondus. Afin de vérifier et valider l'hypothèse selon laquelle le  $PRI_0$  est dépendant de la biochimie de la feuille, la seconde approche a consisté à

mesurer le  $PRI_0$  à l'échelle de la feuille en lien avec la fluorescence. Ces deux approches ont été validées et ont mis en évidence la forte corrélation entre ce paramètre du PRI et la teneur en chlorophylle des feuilles obtenues par mesures directes (Chap.III, Table 1), par analyses spectrophotométriques de laboratoire (Chap.II, Table 2) et par mesures optiques in situ grâce à l'indice du  $mNDI_{705}$  (Chap.II, Fig. 10a, Chap.III, Fig. 4a) lui même très fortement corrélé au contenu en chlorophylle foliaire comme montré dans d'autres travaux (Sims et Gamon, 2002). A l'échelle de la canopée, le  $PRI_0$  est corrélé aussi bien au contenu en chlorophylle mesuré sur un échantillon de feuilles qu'au contenu total en chlorophylle de l'ensemble du couvert estimé à l'aide de l'indice  $mNDI_{705}$  du couvert. Dans ces conditions, en tant qu'indices optiques mesurés à l'échelle du couvert, le  $PRI_0$  et le  $mNDI_{705}$ , sont non seulement liés au contenu total en chlorophylle du couvert mais aussi à sa structure en raison de la dépendance entre le  $mNDI_{705}$  et l'indice foliaire ou le  $faPAR$  (Chap. II, Fig. 2b et Fig. 4). Ce résultat est aussi conforme aux résultats obtenus dans des études antérieures, et en particulier Xiao et al. (2013). Cette relation  $PRI_0$  et contenu en chlorophylle est maintenue chez les 5 espèces étudiées (Hêtre commun, Chêne vert, Chêne pédonculé, Chêne sessile et Pin sylvestre) quelque soit l'état phénologique des feuilles et la contrainte abiotique appliquée aux différents stades foliaires (débourrement, saison de végétation et sénescence).

Les valeurs de  $PRI_0$  foliaires ont pu être mises en relation avec les valeurs de fluorescence des feuilles adaptées à l'obscurité ( $F_o$  et  $F_m$ ) mais cette approche nécessite des études complémentaires afin d'affiner la compréhension des liens entre fluorescence et mesures optiques sur des feuilles adaptées à l'obscurité.

Ce travail a montré qu'en fonction de la sensibilité des espèces aux contraintes abiotiques, la variabilité du  $PRI_0$  est fortement liée à l'intensité des stress. La comparaison de pente des relations entre  $PRI_0$  et variables explicatives de ces stress a mis en évidence des réponses différentes entre espèces et stress considérés (Chap.III, Table 2). Cela souligne l'existence de

réponses biochimiques contrastées en fonction de l'espèce et de l'intensité et sources du stress, certaines étant plus sensibles que d'autres. Fréchette et al. (2015) montrent ainsi une variabilité du PRI liée à la composition en pigment sur le long terme 6 fois supérieure à celle liée au cycle des xanthophylles sur le court terme. La variabilité du  $PRI_0$  est donc importante et nécessite d'être prise en compte lors de l'étude du PRI.

## **1.2. L'intervalle de variabilité du PRI : le $\Delta$ PRI**

La variabilité du PRI en réponse au rayonnement est comprise entre les valeurs de  $PRI_0$  et les valeurs de PRI maximales à saturation. Cette variabilité, nommée  $\Delta$ PRI, a été étudiée à partir des courbes PRI vs. PAR à l'échelle de la journée. Le  $\Delta$ PRI reflète la dynamique temporelle du PRI, à l'échelle de temps considérée, en réponse aux conditions d'éclairement. En d'autres termes il s'agit de la variabilité du cycle des xanthophylles en réponse au PAR incident. Deux hypothèses sont avancées, la première est que  $\Delta$ PRI est lié au contenu en xanthophylle et implique que les valeurs de  $\Delta$ PRI augmentent lorsque davantage de violaxanthine (V) est convertie en anthéroxanthine (A) et en zéaxanthine (Z), notamment en condition de stress. La seconde hypothèse est que  $\Delta$ PRI est lié au niveau de déépoxydation des xanthophylles et répond à un ratio de xanthophylle déépoxydé sur le total de xanthophylle disponible. Dans le chapitre II (Merlier et al., 2015), le  $\Delta$ PRI n'a montré aucune variation au cours de la saison pour le chêne pédonculé et le hêtre commun et entre les différentes conditions hydriques imposées. Le pin montre une différence significative du  $\Delta$ PRI entre les plantes contrôles et les plantes soumises à un déficit en eau du sol mais cette différence reste faible et inexplicée. Ces résultats sont en accord avec Hmimina et al. (2015) et Gamon et Surfus (1999) qui ne montrent pas de variation de ce paramètre. De plus aucune corrélation avec la concentration en contenu en xanthophylle n'a été observée au cours de la saison. En effet, tandis que le  $\Delta$ PRI ne varie pas, la concentration totale en xanthophylle des espèces décidues étudiées diminue au cours de la saison (zéaxanthine (Z) + anthéroxanthine (A) +

violaxanthine (V), Chap.II, Fig. 5a). Garcia-Plazaola et al. (1997) Filella et al. (2009) observent une variabilité de ce pool en fonction du niveau d'éclairement des feuilles au cours de la saison (et notamment une augmentation du pool total de xanthophylles pour les feuilles de lumière). Ces résultats laissent supposer que le  $\Delta$ PRI répond à un ratio de dé-époxydation des xanthophylles, plutôt qu'à une concentration. Des études ont montré que le PRI répond effectivement à un ratio de xanthophylles  $(Z+A)/(Z+A+V)$  (Demmig-Adams & Adams, 1966 ; Filella et al., 2009 ; Porcar-Castell et al., 2012 ; Gamon et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans le Chap.II qui ne montrent pas de variabilité des différents pools de xanthophylles au cours de l'année.

Des études plus approfondies sur le  $\Delta$ PRI en lien avec le niveau de dé-époxydation des xanthophylles devraient être menées pour mieux comprendre ce paramètre et les mécanismes sous jacents. En effet, l'absence de variabilité observée dans ce travail peut confirmer l'hypothèse d'un ratio mais peut aussi être expliquée par nos conditions expérimentales, où l'échantillonnage est effectué en état de conversion maximale des xanthophylles, ce qui ne permet pas de confirmer cette hypothèse. De plus, il est possible que la variabilité du  $\Delta$ PRI soit en partie masquée par la variabilité du  $PRI_0$  dans le modèle utilisé. Une approche intégrée pourrait être réalisée à l'aide de courbes de réponse du PRI à de nombreux paliers de PAR, pour lesquels la concentration en Z, A et V est connue.

### **1.3. La variabilité physiologique : le $PAR_{sat}$**

Le troisième paramètre dérivé de l'analyse des relations entre PRI et PAR est le  $PAR_{sat}$  correspondant à la valeur de PAR à partir de laquelle le PRI sature. En d'autres termes, à ce niveau de PAR, il n'y a plus de variation du PRI car toute la violaxanthine disponible pour le cycle des xanthophylles est convertie en zéaxanthine, afin de permettre la dissipation thermique de la lumière incidente par l'intermédiaire des mécanismes du NPQ. Ainsi, une valeur de  $PAR_{sat}$  élevée correspond à une feuille possédant une forte capacité d'assimilation



de la lumière incidente et donc une mise en place lente des mécanismes de protection liés au cycle des xanthophylles lorsque le PAR augmente. Le contenu en violaxanthine est converti en zéaxanthine pour un PAR plus important, entraînant de concert une saturation du PRI. A l'inverse, une feuille peu adaptée à la lumière, ou subissant un stress, a une capacité d'assimilation de la lumière faible. Ses photosystèmesaturent pour un PAR incident réduit et sa valeur de  $PAR_{sat}$  est diminuée.

A l'échelle de la canopée et sur une année de mesure, le  $PAR_{sat}$  montre un pattern similaire à celui du  $mNDI_{705}$  avec une plus grande variabilité temporelle (Chap II, Fig. 4 et Fig. 9). Cette variabilité additionnelle a été étudiée et montre que le  $PAR_{sat}$  est non seulement significativement corrélé au contenu en chlorophylle mais aussi au contenu en eau du sol (Chap.II, Fig. 10). La contribution de ces deux facteurs est différente en fonction de la période de l'année. Lors de la période de végétation, et à l'échelle de la canopée, le facteur explicatif de la variabilité du  $PAR_{sat}$  est le contenu en eau du sol (Chap.II, Fig. 10c, Chap.IV, Fig. 5). En effet, la disponibilité en eau peut limiter le taux de photosynthèse et induire l'établissement précoce des mécanismes de NPQ afin de protéger la plante de l'excès d'énergie absorbée. Ceci est confirmé par la relation positive entre le  $PAR_{sat}$  et le contenu en eau du sol qui indique que les processus liés aux NPQ se mettent en place d'autant plus rapidement que ce contenu en eau est faible. Cependant, lors du débourrement et de la sénescence, cette relation est masquée par la plus forte contribution de la chlorophylle du couvert (estimée à partir du  $mNDI_{705}$ ) dans la variabilité du  $PAR_{sat}$  (Chap.II, Fig. 11). Ces deux phases phénologiques étant sujettes à une grande variabilité du contenu en chlorophylle, les mécanismes physiologiques liés à la photosynthèse sont limités par la teneur en chlorophylle des feuilles. A l'échelle de la feuille, l'approche développée dans le chapitre III a permis d'aller plus loin et de mettre en évidence la relation entre le  $PAR_{sat}$  et les stress appliqués. A l'échelle de la feuille, ce paramètre est corrélé au déficit en eau de l'atmosphère et à l'ozone (Chap.III, Table 2). Les résultats des deux approches à l'échelle du couvert et celle à l'échelle de la feuille

développées dans ce travail permettent de mettre en évidence une forte relation entre le  $PAR_{sat}$  et les facteurs limitants la photosynthèse.

L'analyse des pentes entre le  $PAR_{sat}$  et le facteur explicatif considéré (dans notre cas le pouvoir évaporant de l'air, EA pour le déficit en eau de l'atmosphère et l'AOT40 pour l'ozone) a montré une relation linéaire unique pour chacun des traitements et espèces. Le  $PAR_{sat}$  peut être considéré comme un potentiel proxy du fonctionnement physiologique des feuilles car il dépend de leurs réponses aux contraintes abiotiques. Un approfondissement de la compréhension de ce paramètre est nécessaire pour confirmer ces résultats avec d'autres espèces et contraintes.

Enfin, on peut noter que le  $PRI_0$  comme variable quantifiant la composante phénologique du PRI et le  $PAR_{sat}$  comme variable quantifiant la composante physiologique du PRI vont dans le sens des résultats décrits par Gamon et Berry (2012) et Hmimina et al. (2013 ; 2015, Annexe 2) qui décrivent la variabilité du PRI comme le cumul d'une variabilité constitutive due aux variations de composition chimique des feuilles et d'une variabilité facultative due à l'activité du cycle des xanthophylles.

## **2. Le PRI en tant que proxy du fonctionnement photosynthétique est sujet à des facteurs de variabilité liés aux contraintes abiotiques**

### **2.1. L'usage d'indices optiques pour suivre les impacts des facteurs abiotiques sur la photosynthèse**

La disponibilité en eau du milieu est un facteur limitant la photosynthèse de part son implication majeure dans ce processus. Le déficit en eau impacte dans un premier temps les mécanismes physiologiques de la plante en limitant sa photosynthèse, puis si le stress persiste,

la phénologie de la plante est altérée et on observe des nécroses, des brunissements voir des phénomènes de chutes foliaires. Ces dommages se retrouvent aussi chez les plantes sujettes à une exposition chronique à un agent polluant toxique, tel que l'ozone qui détériore l'activité des photosystèmes. L'usage d'indices tels que le NDVI (normalised difference vegetation index) et le mNDI<sub>705</sub> (modified normalised difference index) est répandu et permet de suivre ces réponses phénologiques de la canopée. Le NDVI permet principalement d'accéder à la structure de la canopée et à sa variabilité temporelle intra et interannuelle (Soudani et al., 2012), tandis que le mNDI<sub>705</sub> est un bon proxy de l'état biochimique des feuilles et des couverts à l'échelle saisonnière. Cependant ces indices permettent de mettre en évidence l'état de stress des plantes seulement lorsque les dommages sur la plante sont déjà établis. L'utilisation du PRI peut permettre d'accéder à l'état de stress de manière plus efficace, et cela avant que les symptômes n'apparaissent, grâce à sa capacité à suivre le rendement de la photosynthèse de l'échelle de la minute à l'échelle de l'année.

Comme montré plus haut, les mesures de PRI peuvent être déconvoluées afin de distinguer une partie physiologique, le PAR<sub>sat</sub>, d'une partie phénologique, le PRI<sub>0</sub>. Le PRI<sub>0</sub> étant très corrélé aux composantes biochimiques et structurales des feuilles et de la canopée, il a permis de corriger la variabilité saisonnière et inter-feuille du PRI de manière à obtenir un PRI<sub>c</sub> (PRI corrigé) moins sensible aux propriétés phénologiques du couvert. Ce PRI<sub>c</sub> est très corrélé au NPQ (Chap.III, Fig. 6), et donc au cycle des xanthophylles, et permet d'obtenir une forte relation avec la LUE.

## **2.2. Effets des variations de lumière incidente**

La photosynthèse des plantes est très sensible aux conditions d'éclairement, et varie rapidement avec les changements de lumière incidente, notamment en cas de passages nuageux. Le PRI à l'échelle journalière est directement affecté par les variations de PAR incident avec un pattern opposé (Chap. II, Fig. 7) et la relation observée entre ces variables est

de forme exponentielle (Chap.II, Fig. 8). Cette relation a permis de mettre en évidence différents paramètres estimés ( $PRI_0$ ,  $PAR_{sat}$  et  $\Delta PRI$ ) qui s'avèrent de bons indicateurs pour étudier le fonctionnement des feuilles et des canopées. Le  $PRI_0$  est un paramètre dont la variabilité et l'implication dans le PRI est importante de part sa corrélation au contenu en chlorophylle et à la structure du couvert. En tant que valeur de l'ordonnée à l'origine de cette relation exponentielle négative, il s'avère important d'étudier les relations PRI vs. PAR avec une résolution et une échelle temporelle fine. Cela afin d'estimer au mieux ce paramètre et d'éviter sa variabilité qui conduirait à un découplage de la relation entre PRI et PAR et une mauvaise estimation du  $PRI_c$ . Dans cette étude, les corrélations entre PRI et PAR sont mises en évidence sur une période de quelques minutes à l'échelle de la feuille et d'un jour à l'échelle de la canopée avec une résolution temporelle fine (environ un spectre par minute, Chap.II, ou seconde, Chap IV). Une résolution temporelle fine est nécessaire au suivi du fonctionnement de la photosynthèse et cela pour deux raisons principales :

- De nombreuses mesures de PRI à faibles lumières sont nécessaires à l'estimation précise du  $PRI_0$  car la variabilité du PRI est importante aux niveaux de PAR faibles (Chap.II, Fig. 8)

- Le PRI sature pour des valeurs de PAR relativement faibles suivant l'espèce considérée (dans nos conditions expérimentales : de 200 à 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de PAR pour le hêtre commun, de 300 à 800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de PAR pour le chêne pédonculé). Lorsque l'intensité lumineuse incidente est élevée, notamment à midi, le PRI sature et son analyse ne reflète plus les variations du cycle des xanthophylles en lien avec la dé-époxydation. Ces résultats sont aussi observés dans Kováč et al. (2013).

Si ces conditions ne sont pas remplies, la variabilité inter-journalière et saisonnière mesurée du PRI reflète davantage la composante phénologique du PRI que sa composante physiologique. En effet, la composante phénologique est prépondérante dans le PRI et induit une forte variabilité du PRI inter-feuilles et saisonnière à l'échelle de la canopée.

### **3. Le PRI en tant que signal optique composite est sujet à des facteurs de variabilité spatiale et temporelle**

La variabilité inter et intra-sites, qu'elle soit temporelle ou spatiale, est souvent liée à la structure du couvert et à sa biochimie. En effet, le LAI et le  $mNDI_{705}$ , indices respectivement liés à ces deux variabilités, sont corrélés aux variations du PRI, et plus particulièrement au paramètre  $PRI_0$ , au cours de la saison et entre sites. A l'échelle de la feuille le  $mNDI_{705}$  est un indice qui est lié au contenu en chlorophylle. A l'échelle de la canopée le  $mNDI_{705}$  est aussi lié à la variabilité du contenu en chlorophylle à laquelle s'ajoute de la variabilité liée à la structure du couvert, et il s'avère difficile d'estimer la part de chaque variabilité. Dans ce manuscrit, une forte relation linéaire entre le  $mNDI_{705}$  et le contenu en chlorophylle à l'échelle de la feuille (Chap.III, Fig. 3) et à l'échelle de la canopée pour les feuilles de lumière (Chap.II, Fig. 3) a été montrée. Cette relation est différente pour les feuilles d'ombre et de lumière. Pour les feuilles d'ombre, la relation entre  $mNDI_{705}$  à l'échelle de la canopée et le contenu en chlorophylle foliaire atteint un plateau au niveau de la concentration maximale en chlorophylle mesurée, ce qui s'explique par l'incapacité de cet indice optique à répondre aux propriétés biochimiques des feuilles d'ombre dans un couvert fermé. Ainsi les variations structurales et biochimiques, et spatiales et temporelles, des couverts végétaux engendrent de la variabilité dans le signal du PRI avec une importance variable de la proportion de feuilles d'ombre et de lumière dans le signal.

Le PRI est sensible à la variabilité du LAI et du contenu en chlorophylle des couverts végétaux ce qui biaise l'interprétation du signal PRI en tant que proxy de la LUE. Cela peut expliquer les relations obtenues dans la littérature qui montrent des relations significatives mais différentes entre les types de peuplement décidus, sempervirents et herbacés (Nichol et al., 2002). A l'échelle du couvert, la relation obtenue entre PRI et LUE est de forme exponentielle lorsque différentes espèces sont combinées (Garbulsky et al., 2011 ; Hmimina

et al., 2015, Annexe 2, Fig. 9) alors qu'elle est linéaire entre  $PRI_c$  et LUE (Hmimina et al., 2015, Annexe 2, Fig. 9). La forme exponentielle est due à l'implication de la structure et de la biochimie du couvert qui sont différentes entre espèces, et la relation qui en découle est composée de nombreuses relations linéaires qui se déplacent sur l'axe du PRI. Ce phénomène se retrouve à l'échelle de la feuille, au sein d'une même espèce, avec la stratification verticale qui induit l'implication de feuille d'ombres et de lumières (montré avec la relation PRI vs. Y(II) dans le Chap.III), mais aussi à l'échelle de la canopée et de l'année, reflétant l'importance de la composante biochimique dans le signal au cours de la saison, notamment chez les espèces décidues. En utilisant le  $PRI_c$ , c'est-à-dire en supprimant le  $PRI_0$  et la composante phénologique du signal, la relation obtenue entre PRI et fonctionnement physiologique est de forme linéaire.

Ces résultats mettent en évidence l'importance de la variabilité spatiale et de la variabilité temporelle dans le signal du PRI et notamment concernant la structure et la biochimie du couvert.

## **4. Conclusions**

Le PRI est un indicateur prometteur du fonctionnement photosynthétique des plantes de part son utilisation aux différentes échelles temporelles et spatiales (mesures instantanées ou suivi sur le long terme à l'échelle de la feuille, du couvert ou des peuplements) mais son interprétation est complexe compte tenu de la variabilité induite par sa sensibilité à la fois aux facteurs structuraux, biochimiques et physiologiques des couverts végétaux. Ce travail a mis en évidence la nécessité de recourir à une haute résolution temporelle d'acquisition du PRI car cet indice répond très rapidement aux variations des conditions d'éclairement. L'accès aux paramètres qui décrivent précisément cette réponse est nécessaire à la déconvolution des composantes phénologique et physiologique qui les font varier. Mieux comprendre le signal

du PRI est un pré-requis au suivi du fonctionnement photosynthétique à l'échelle de la canopée. L'approche PRI vs. PAR présentée dans ce travail représente une première réponse quant à l'interprétation du signal et permet d'obtenir un  $PRI_c$  fortement lié à l'efficacité de la plante à utiliser la lumière. Bien que la mise en place de mesures sensibles à haute résolution temporelle présente des difficultés de mise en œuvre à grande échelle, son recours à l'échelle de la canopée grâce à des capteurs *in situ* représente une avancée majeure dans le suivi du fonctionnement des écosystèmes.

En tant qu'indice optique à base de réflectances dans le visible, le PRI est limité au feuillage de la première couche de la canopée, ce qui implique une faible représentativité du fonctionnement global pour les couverts à fort LAI et peut entraîner une perte de relation avec la LUE. Des études sur l'impact de la stratification dans le couvert sont nécessaires, notamment à l'aide du couplage des mesures *in situ* et de la modélisation afin de prendre en compte l'implication des feuilles des strates inférieures aussi bien dans le PRI que dans la LUE. Ceci peut être réalisé grâce à un couplage d'un modèle de fonctionnement carboné basé sur des processus tels que CASTANEA (Dufrêne et al., 2005) qui permet de simuler la photosynthèse par strate et un modèle de transfert radiatif tel que le modèle DART (Gastellu-Etchegorry et al., 2004). A l'heure actuelle ce type de modèle ne tient pas compte des mécanismes physiologiques à l'origine de la variabilité de réflectance des couverts dans les bandes du PRI et qui sont associées au cycle des xanthophylles en réponses aux conditions d'éclairement et de contraintes abiotiques. Ce type d'approche nécessite une caractérisation fine des propriétés optiques et biochimiques foliaires (chlorophylle et xanthophylles) selon un gradient vertical dans la canopée. La mise en œuvre de cette approche sur un site de mesure de flux de carbone et d'eau et de PRI à l'échelle du couvert, pour les besoins de validation, permettra de mieux comprendre l'effet de la stratification sur les relations PRI vs. LUE.

A l'échelle foliaire, l'acquisition de propriétés spectrales et de fluorescence chlorophyllienne (telles que développées dans le chapitre III) pourrait être couplée aux mesures d'échanges gazeux en conditions contrôlées. Cette approche permettra d'une part d'avoir accès de manière exhaustive au fonctionnement photosynthétique en conditions contrôlées (notamment à l'aide d'un couplage avec le LiCor 6400) simultanément à des mesures optiques, et permettra d'autre part le suivi de ces deux catégories de variables (écophysiological et optiques) en réponses à des variations fines des conditions environnementales au sein de la chambre de mesure.

En outre ces approches aussi bien à l'échelle de la feuille que du couvert doivent être accompagnées par une caractérisation de la variabilité des xanthophylles aux échelles intra-journalière et saisonnière afin de mieux comprendre le lien entre le PRI et l'activité du cycle des xanthophylles.





# ANNEXES

## **Annexe 1:**

Protocol of quantification of xanthophylls content in woody species by UPLC-TOF analysis

## **Annexe 2:**

Hmimina G., Merlier E., Dufrêne E., Soudani K., 2015. Deconvolution of pigment and physiologically-related PRI variability at the canopy scale over an entire growing season, *Plant. Cell Environ.* doi:10.1111/pce.12509.



## **Annexe 1**

# **Quantification of xanthophylls content in woody species by UPLC-TOF analysis**

---

Xanthophyll pigment cycle has a crucial role of photoprotection to maintain photosynthetic functions. Plants collect photons for the photosynthetic system using pigment-protein complexes in thylakoid membranes. When the incoming photons exceed the photosynthetic rate, the energy absorbed may lead to photo-oxidative damages to the photosynthetic apparatus and other essential cell components. To avoid such damages, mechanisms to dissipate the excess energy is used by the leaf. These processes are induced by a lower pH within the photosynthetic membrane, which activates a particular carotenoids cycle, the xanthophyll cycle. The violaxanthin is converted into antheraxanthin, then zeaxanthin, which allows dissipating energy by heat (R.Goss et al., 1998; Demming-Adams et al. 1988, Telfer A, 2002, Jahns P, Holzwarth AR, 2012).

This non photochemical quenching consists in the involvement of two enzymes, the violaxanthin de-epoxidase (VDE) which converts violaxanthin into antheraxanthin then zeaxanthin, and the zeaxanthin epoxidase (ZE), which, on the contrary, converts zeaxanthin into antheraxanthin and then violaxanthin. VDE is located in the luminal surfaces of the thylakoid membrane and required ascorbic acid and a pH of 7.5 to be activated (D.Siefermann, H.Y., 1988, Yamamoto, 1975) whereas ZE is located on the stromal surface of the thylakoid membranes (H.Y. Yamamoto, 1979). Thus, the xanthophyll cycle allows monitoring the photosynthetic state of the leaf.

Xanthophyll pigments are commonly quantified using HPLC-UV methods (Susan S. et al., 1990; Bino RJ et al.2005), and recently using a coupling with Mass Spectrometry (MS) using HPLC-time of flight (TOF) (Aparicio-Ruiz R et al., 2011) or triple quadrupole (QqQ) (Gentili A, Caretti F, 2011) as MS. These strategies are time consuming as they require further fragmentation studies and identification of pigments present in the sample (Gentili A, Caretti F, 2011).

Recently, UPLC-MS was developed to reduce analysis time and sample quantity, and increase accuracy collecting both unfragmented and fragmented ions (Bateman KP et al., 2007). The major difficulty in the application of these methods for the xanthophylls is the extraction pigment. It appears difficult to separate lutein [beta, e-carotene-3,3'-diol] and zeaxanthin [beta,beta-carotene-3,3'-diol] which are two isomers that only differ in the position of one double bond. Extraction procedures have been reported and described by few works but are complex and time consuming (Khachik et al., 1986 Chen and Chen, 1993, Yamauchi and Watada, 1993). The use of woody species samples makes the extraction more difficult, due to the presence of lignin.

This protocol is a method for the quantification of xanthophyll pigments in woody species. We used an UPLC-UV-MS coupling with TOF methods to separate violaxanthin, antheraxanthin and the 2 isomers zeaxanthin and lutein in a 27 minutes analysis.

## **1. Protocol**

All the leaves were immediately packed in aluminium paper after sampling, frozen in liquid nitrogen and preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Then, leaves are lyophilized and weighted. The samples are crushed and the resulting powder was kept in the dark and at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **1.1. Xanthophyll extraction**

The extraction protocol was based on Alegre & Munne (2000). 20 mg of leaf powder was extracted with 1 ml of cold 85% w/w acetone using a cooled mixer mills with micro-bead during 2 minutes at 1800 rpm. Then, the extract was centrifuged for 10 min at 4°C at 5000 rpm, and the supernatant was transferred to another flask. The pellet was re-extracted with 1 ml of cold 85% w/w acetone and agitated during 10 min at 4°C and 5000 rpm. Supernatant was combined and filtered through a 0.2  $\mu$ m syringe filter. Samples were dried using air flux system and re-concentrated for UPLC-UV injection. 200  $\mu$ L of methanol was added in each sample before the injection.

## **1.2. Liquid chromatography and UV detection**

UPLC-UV separation was performed on an ACQUITY UPLC (Waters, MS Technology, UK) in reversed-phase, using an ACQUITY UPLC HSS T3 1.8  $\mu$ m (2.1 x 100 mm) column + a pre-column. This protocol was based on Fu (2012). The mobile phase (B1) of UPLC was a mixture of acetonitrile (ACN) + methanol (MeOH) + methyl tert-butyl ether (MTBE) (70 + 10 + 10 + v + v + v) at pH 6.15. Phase A1 was composed of 10 mM ammonium acetate. The column temperature was 45°C, and the elution flow rate at 0.4 ml/minutes with a gradient of 27 minutes. The first 3 minutes were an isocratic gradient with 60% of mobile phase B1, 70% at 7 minutes, 100 % at 20 minutes and 98 % at 23 minutes during 1 minute and 60% between 24 and 27 minutes. This gradient allowed the separation of lutein and zeaxanthin which are initially co-elute. Standards were purchased by DHI (Denmark) for antheraxanthin and violaxanthin and by LGC Standards (France) for zeaxanthin and lutein, and were used in 8 concentrations from 0.05  $\mu$ M to 20  $\mu$ M for the standard range. The elution time

was 11.65 minutes for the violaxanthin, 13.44 minutes for the antheraxanthin, 14.91 minutes for the zeaxanthin and 15.08 minutes for the lutein.

The UPLC-UV was coupled in line with a Time-Of-Flight system (MicroTOF II, Bruker Daltonics, Wissembourg, France), using the positive mode of electrospray ionization interface. We used Lithium hydroxide (LiOH) as solvent reference at 0.135 mL/hour debit.

Xanthophyll data were acquired and processed using the softwares MicroTOF-Control, Data-analysis and Target-Analysis (Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

## **Annexe 2**

# **Deconvolution of pigment and physiologically-related PRI variability at the canopy scale over an entire growing season**

---

Hmimina G.<sup>a</sup>; Merlier E.<sup>a</sup>; Dufrêne E.<sup>b</sup>; Soudani K.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, F-91405

CNRS, Orsay, France

<sup>b</sup> CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, F-91405, Orsay, France

Corresponding author: [gabriel.hmimina@u-psud.fr](mailto:gabriel.hmimina@u-psud.fr)

doi:10.1111/pce.12509.



## **1. Abstract**

The sensitivity of the photochemical reflectance index (PRI) to leaf pigmentation and its impacts on its potential as a proxy for light use efficiency (LUE) have recently been shown to be problematic at the leaf scale. Most leaf-to-leaf and seasonal variability can be explained by such a confounding effect. This study relies on the analysis of PRI light curves that were generated at the canopy scale under natural conditions to derive a precise deconvolution of pigment- and physiologically-related variability in the PRI. These sources of variability were explained by measured or estimated physiologically relevant variables, such as soil water content, that can be used as indicators of water availability and canopy chlorophyll content. The PRI mainly reflected the variability in the pigment content of the canopy. However, the corrected PRI, which was obtained by subtracting the pigment-related seasonal variability from the PRI measurement, was highly correlated with the upscaled LUE measurements. Moreover, the sensitivity of the PRI to the leaf pigment content may mask the PRI versus LUE relationship or result in an artificial relationship that reflects the relationship of chlorophyll versus LUE, depending on the species phenology.

## **Keyword index**

Photochemical reflectance index, PRI, light use efficiency, LUE, drought

## 2. Introduction

The FLUXNET global network consists of more than 500 flux tower sites that use the eddy-covariance method to directly measure regional-scale canopy carbon fluxes (Baldocchi et al. 2001). However, the extrapolation of these measurements to all biomes is problematic because the density of the flux tower sites may not be sufficient for describing the spatial heterogeneity of carbon fluxes, particularly in tropical ecosystems, which exhibit the highest gross primary productivity (GPP) (Jung et al. 2009). An alternative option is provided by the MODIS project, which aims to derive GPP and annual NPP (net primary production) maps across the globe with an 8-day time step (for GPP) and a spatial resolution of 1 km<sup>2</sup>. The light use efficiency (LUE) estimation used in the MODIS model relies on biome-specific maximum LUE values that are modulated based on daily minimum temperature and vapor pressure deficits (VPD), as described by Running et al. (2000). When the resulting modeled GPP values were compared with the flux tower-based measurements, inaccurate LUE estimations were a major source of uncertainty (Gebremichael and Barros 2006; Turner et al. 2006). Thus, the retrieval of canopy LUE is important for accurately estimating the global carbon budget.

In the last twenty years, considerable research has focused on using the photochemical reflectance index (PRI) to assess the LUE over broad spatial scales. The PRI, which is based on the canopy reflectance in two bands centered at 531 and 570 nm (Gamon et al. 1997), was developed to track the violaxanthin-based xanthophyll cycle (Gamon et al. 1990, 1992, 1997), which plays an important role in the regulation of LUE (Demmig-Adams and Adams 1996). Because this index is based on reflectances, it can be estimated using satellite data, including MODIS images, which have been used extensively to compute PRI at a daily temporal resolution and at a spatial resolution of 1-km<sup>2</sup> (Drolet et al. 2005; Drolet et al. 2008; Goerner et al. 2009; Moreno et al. 2012).

Good relationships between the PRI and LUE over short periods have been shown for several species at the leaf (Penuelas et al. 1995, Gamon et al. 1992 and 1997, Guo and Trotter 2004, Nakaji et al. 2006) and canopy scale (Filella et al. 1996, Trotter et al. 2002, Wu et al. 2010). However, at the seasonal scale, the relationships between these variables deteriorate (Garbulky et al. 2011, Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012, Hmimina et al. 2013).

The sensitivity of the PRI to the proportions of sunlit and shaded leaves in the canopy, which depend on the 3D canopy structure and sun-view geometry (Barton et al. 2001; Hall et al. 2008; Hilker et al. 2008; Hilker et al. 2009; Hilker et al. 2010; Garrity et al. 2011), have been studied extensively as a possible explanation for contrasting results (Hilker et al. 2008; Garbulky et al. 2011).

In addition, the PRI is strongly related to the leaf pigment content (i.e., the chlorophyll content (Moran et al. 2000) and the carotenoid to chlorophyll ratio (Sims and Gamon 2002; Stylinski et al. 2002; Filella et al. 2009)). This sensitivity to the leaf pigment content was recently shown to introduce variability in the PRI versus LUE responses (Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012, Gamon and Berry 2012, Hmimina et al. 2013). While the LUE accounts for most of the facultative diurnal PRI variability, the constitutive pigment-related PRI variability at the seasonal scale introduces a change in the PRI versus LUE relationship.

The effects of this constitutive PRI variability on the PRI versus LUE relationship at the canopy scale remain unclear. For example, a clear decrease in the PRI versus LUE correlation was observed at the leaf scale due to changes in the leaf pigment content. However, similar results were not observed at the canopy level or at the seasonal scale (Garbulsky et al. 2011). The observed PRI versus LUE relationships at such scales may result from correlations between the LUE and leaf area index (LAI) or leaf pigment content. Thus, these relationships may be year, site and scale dependent, as suggested by Hmimina et al. (2013).

In summary, the PRI has been shown to be a composite signal at the leaf and canopy scale. The PRI is composed of responses to the leaf pigment content and the physiological

responses of the leaves to environmental conditions. These effects could be disentangled at the leaf scale and a strong impact of leaf pigment content on the PRI versus LUE relationship was shown in Hmimina et al. 2013. These effects are poorly documented at the canopy scale. The canopy pigment content is expected to strongly affect the PRI versus LUE relationships, but have not been described yet.

The aim of this study is to assess and explain the variability in the PRI of different tree species under natural conditions over a wide range of total chlorophyll and soil water contents. Specifically, we focus on distinguishing between the variability due to changes in canopy light use efficiency and variability due to canopy structural and biochemical properties in order to assess the effects of the composite nature of the PRI on its use as a proxy for LUE.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Plant materials and experimental setup**

One hundred three-year-old oak (*Quercus robur* L.), beech (*Fagus sylvatica* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) saplings were divided into two groups of fifty individuals each (see Hmimina et al. 2013). The species within a group had similar heights (approximately 45 to 60 cm for oak, 40 to 55 cm for beech, and 30 to 40 cm for pine). Each group was assigned to a 2- x 2- x 0.5-m outdoor planter box. For each species, the planter boxes were equipped with one or two drains at the bottom of the box to create different soil water contents. The saplings were planted in February 2011 into a medium containing 2/3 compost and 1/3 sand. Throughout the entire experiment, the 6 planter boxes were covered using a plastic tarp during strong rain events and were differentially irrigated to introduce different soil moisture contents while avoiding severe water stress.

## 3.2. Measurements

### 3.2.1. Canopy-scale measurements

The six planter boxes were placed under a 3- to 5-m tall galvanized steel pipe greenhouse structure with an adjustable height. Two cross bars of the greenhouse structure were located directly above the center of each planter box and were used for attaching optical fibers. Six fibers (Numerical aperture 0.37, core diameter 200  $\mu\text{m}$ , field of view 43.4°, Thorlabs, Inc., USA) pointed downwards to collect the reflected radiation from each planter box. The height of the entire structure was adjusted so that the distance between the optical fibers and the soil was 2.5 m, allowing each field of view of each fiber to cover a diameter of approximately 1.90 m at the ground level. The alignment and field of view of each fiber was checked at the beginning of the experiment, and the effective field of view diameter at the canopy-level was 1.42 m, 1.53 m and 1.6 m for oak, beech and pine, respectively. One optical fiber, directed toward the sky and equipped with a cosine corrector (Ocean optics, IL, USA), was mounted on top of the structure and used to measure the incident photosynthetic photon flux density (PPFD). Another fiber was pointed downward 7 cm from a Spectralon reference panel (Spectralon 99%, 25 cm \* 25 cm, Labsphere, Inc., USA) to collect the reflected upwelling irradiance. The Spectralon reference panel was located immediately adjacent to the planter boxes and was positioned at a height of approximately 1.5 m (i.e., the same level as the top of the tree canopy). All optical fibers were connected to an optical multiplexer with 16 input ports (MPM2000, OceanOptics, IL, USA). The 8 unused input ports were masked and used to measure the dark noise (instrumental noise) associated with each used input port. The output port was connected to a spectrometer (USB2000 + 350-1100 nm,  $\sim 0.3$  nm FWHM (full width at half maximum), OceanOptics, IL, USA). The entire optical setup was calibrated for radiance measurements ( $\text{W}/\text{nm}/\text{m}^2$ ) using a calibration lamp (HL-2000 CAL, OceanOptics, IL, USA) connected to the end of each fiber. The multiplexer and spectrometer were interfaced using a Visual Basic script under OOIBase32 software (OceanOptics, IL,

USA) and were programmed to scan each input port sequentially. When the multiplexer settled on an incoming fiber port, the signal versus noise ratio was checked and the spectrometer integration time was adjusted when necessary.

Photosynthetically active radiation was computed from the radiance data acquired from the Spectralon panel and the cosine corrector by integrating the radiance spectra over an interval of 400-700-nm. The reflectance of each planter box was calculated as the ratio between the reflected radiance from each planter box and the radiance reflected by the Spectralon panel. Then, the reflectance spectra were used to compute three spectral indices as follows:

- The canopy NDVI (Normalized Difference Vegetation index) as an indicator of the canopy structure dynamics using the following formula:

$$- \quad NDVI = \frac{(R_{800} - R_{650})}{(R_{800} + R_{650})} \quad (\text{Eq.1})$$

where  $R_{800}$  and  $R_{650}$  represent the leaf reflectance integrated over the 40- and 20-nm wavelength bands centered at 800 nm and 650 nm, respectively.

- The canopy  $mNDI_{705}$  (modified Red-edge Normalized Difference index) as an indicator of canopy chlorophyll content, which was calculated using the following formula presented in Sims and Gamon (2002):

$$- \quad mNDI_{705} = \frac{(R_{750} - R_{705})}{(R_{750} + R_{705} - 2 * R_{445})} \quad (\text{Eq.2})$$

where  $R_{445}$ ,  $R_{705}$  and  $R_{750}$  represent the canopy reflectance spectrum integrated over a 25-nm waveband centered at 445 nm, 705 nm and 750 nm, respectively. The use of this optical indicator was previously validated at the leaf scale (Hmimina et al. 2013).

- The canopy PRI was calculated using the following formula:

$$- \quad PRI = \frac{(R_{531} - R_{570})}{(R_{531} + R_{570})} \quad (\text{Eq.3})$$

where  $R_{531}$  and  $R_{570}$  represent the leaf reflectance integrated over a 10-nm wavelength band centered at 531 nm and 570 nm, respectively.

The soil water contents of the six planter boxes were monitored over the entire soil profile using an access tube installed near the center of each box. Measurements were collected weekly every 5 cm using a PR2 soil moisture profile probe (Delta-T Devices, UK). The PR2 measurements were calibrated for volumetric humidity over ten 250-cm<sup>3</sup> soil samples for each box (a total of 60 samples).

### 3.2.2. Leaf-scale measurements

The leaf LUE was estimated from leaf maturity to senescence (i.e., from DoY 197 to 250) from 9 photosynthetic measurement campaigns that were performed for oak and 6 that were performed for beech using a LICOR 6400-40 open-flow portable photosynthesis system (LICOR, Lincoln, Nebraska USA). All measurements were collected at the incident PPFD using the LICOR quantum sensor. In each planter box, twenty leaves were selected and measured repeatedly from 9 am to 8 pm. Each leaf was measured approximately 5 times per day.

The LUE of Scots pine was not measured for practical reasons (instrument limitation). Nevertheless, the three species were compared by examining the temporal variability of the PRI responses to PPFD and by analyzing the canopy structure and biochemistry.

### 3.2.3. Data analysis

Canopy PRI versus PPFD (canopy PRI light curves) were analyzed on a daily basis using a non-linear regression:

$$PRI(t) = PRI_{0,j} + \Delta PRI_j * erf\left(\frac{PPFD(t)}{PPFD_{sat_j}}\right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{where } erf\left(\frac{PPFD(t)}{PPFD_{sat_j}}\right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{PPFD(t)/PPFD_{sat_j}} e^{-x^2} dx$$

where  $PRI_0$ ,  $\Delta PRI$  and  $PPFD_{sat}$  are three parameters that are determined daily using mean square minimization and Erf represents the Error Function. The speed of xanthophyll de-epoxidation, which is associated with changes in the PRI, followed a Gaussian curve with changes in light intensity (Takizawa et al. 2007). Therefore, the Erf function, which is a Gaussian integral, was used to account for the continuous regulation process of the xanthophyll cycle between a PPFD.

This model allows for the direct retrieval of the  $PRI_0$ , the full range of PRI variation and saturating PPFD values. In addition, this model was used to explain the variability of the PRI.

The time series of the PRI at a seasonal scale was analyzed using the following non-linear model:

$$PRI(t) = a * mNDI_{705}(t) + b + \Delta PRI * Erf\left(\frac{PPFD(t)}{c * RH(t) + d}\right) \quad (\text{Eq. 5})$$

where RH is the soil moisture content and a, b, c, d and  $\Delta PRI$  are the fitted parameters of the model at a seasonal scale. The model goodness of fit was assessed using the  $R^2$  value and the observed versus predicted relationships. The significance level was fixed at 5%.

At the leaf scale, the LUE versus PPFD relationship was determined on a daily basis using the LICOR measurements. A non-rectangular hyperbola model (Thornley 1998) was modified to express the maximum photosynthetic and maximum photosynthetic efficiency parameters as a function of canopy  $mNDI_{705}$  and soil moisture content and was fitted to these relationships.

Photosynthetic assimilation was expressed as follows:

$$A = \frac{PPFD * A_{max} * \theta}{\theta * PPFD + A_{max}} + R_d \quad (\text{Eq. 6})$$

where  $A_{max}$  (light saturated rate of gross photosynthesis) and  $\theta$  (quantum yield of assimilation) were expressed as

$$\begin{aligned} \theta &= f * mNDI_{705} + g \\ A_{max} &= h * mNDI_{705} + i * RH_{soil} + j \end{aligned}$$

and f, g, h, i and j were fitted parameters. The LUE was calculated as



$$LUE = \frac{A}{PPFD}$$

For the days between the measurement campaigns, the LUE was estimated by using the model described above and by measuring the incoming PPFD, soil moisture content and  $mNDI_{705}$ .

## 4. Results

### 4.1. Seasonal variability of the soil water content, canopy structure, pigmentation and light use efficiency

The seasonal dynamics of the NDVI,  $mNDI_{705}$  and soil water content are shown in Fig.1.

The temporal dynamics of the soil water content exhibited an increasing difference between the control and treated plots throughout the entire experimental period for all species (Fig. 1.a). The differences in the soil water status between the species were evident throughout the experiment. The greatest differences between the control and treated plots were observed from DoY 219 onwards. Thus, a wide range of soil water contents (from 5% to 35%) was investigated. Irrigation resulted in peaks in the soil water content, particularly in the control plots.

The temporal dynamics of the canopy NDVI showed an increasing trend until DoY 220, when a plateau was reached. Next, a decreasing trend occurred from DoY 265 in the deciduous oak and beech plots (Fig. 1.b). In the Scots pine plots, the NDVI exhibited a continuous increase until DoY 210, and then reached a plateau before decreasing after DoY 245. The NDVI was relatively stable between DoY 190 and DoY 280 for all species and treatments.

The pattern exhibited by the  $mNDI_{705}$  differed from the NDVI (Fig. 1.c). Moreover, the  $mNDI_{705}$  pattern and magnitude differed between the species. In the oak plots, the  $mNDI_{705}$  increased from the beginning of the study to DoY 220, coinciding with the NDVI increase.

Then, the  $mNDI_{705}$  decreased slowly while the NDVI remained stable. However, in the beech plots, the  $mNDI_{705}$  was lower and linearly decreased throughout the study period. No significant differences were evident between the control and treated oak or beech plots. In Scots pine, a continual increase in the  $mNDI_{705}$  occurred until DoY 250, when a plateau was reached, and decreased after DoY 280. The control and treated Scots pine plots differed significantly.

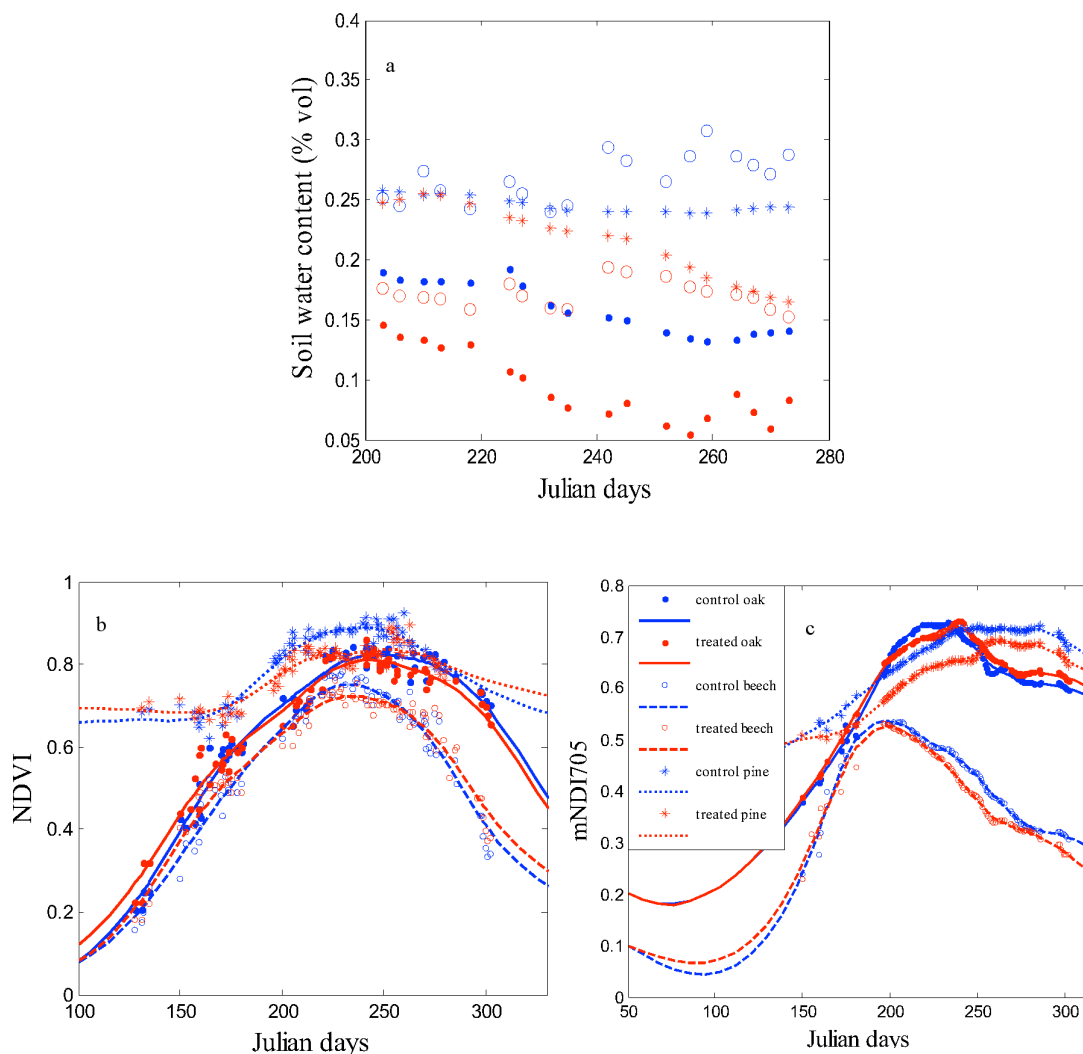


Figure 1. (a) Seasonal dynamic of soil water content at 30 cm depth, (b) canopy normalized difference vegetation index (NDVI), (c) modified red-edge normalized difference index ( $mNDI_{705}$ ). Blue for control plots and red for treated plots; points for oak, empty circles for beech and asterisks for Scots pine.

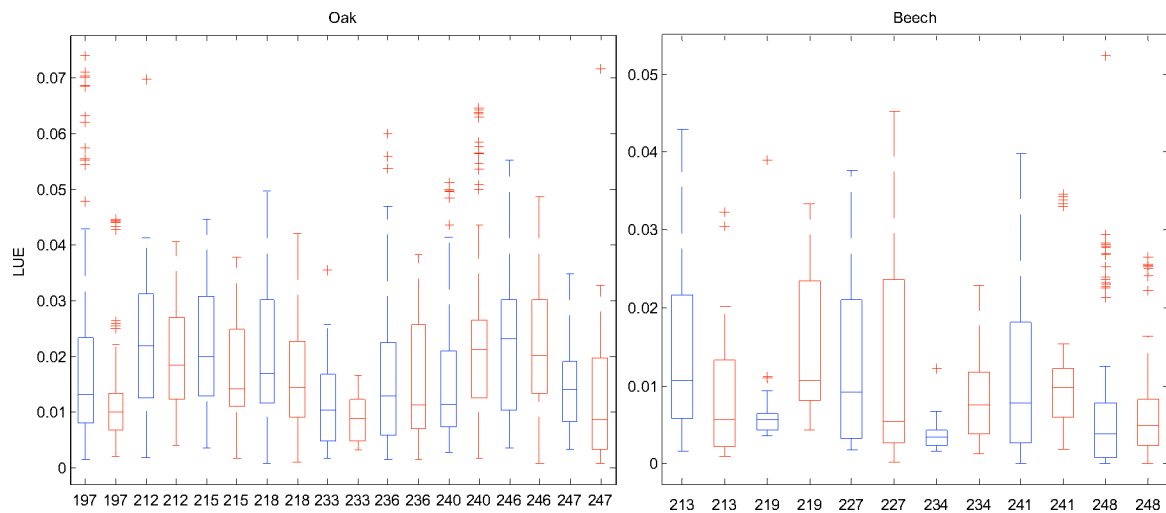
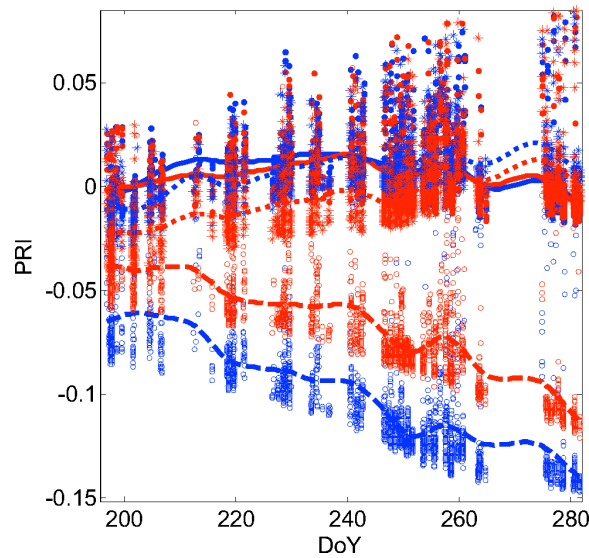


Figure 2. Seasonal dynamic of mean leaf light-use efficiency (LUE;  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1} \text{ photon}$ ) in oak (a) and beech (b) (blue boxes in control and red boxes in treated plots). The centre of each box is the median and bounds correspond to the median 95% confidence interval.

The leaf LUE did not differ significantly between the control and treated beech or oak plots ( $P > 0.05$ ), except for the beech LUE that was measured on DoY 219 and 234 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.04$ , respectively) (Fig. 2). Moreover, the temporal patterns of the LUE over the entire experimental period were similar for these two species. Two peaks in the LUE were observed on DoY 215 and 246 for oak, and between DoY 219 and 227 and on 241 for beech. These patterns differed from the soil water content, and the NDVI and  $\text{mNDI}_{705}$  patterns are shown in Fig. 1.

The variations in the canopy PRI over the entire experimental period are shown in Fig. 3. High variability occurred in the daily PRI values. The PRI increased until DoY 220 in oak and 240 in pine, whereas the beech PRI linearly decreased throughout the entire experiment. These patterns are similar to those observed in the  $\text{mNDI}_{705}$  (Fig. 1).



*Fig. 3: Photochemical reflectance index (PRI) over the whole experiment period for the three species (blue symbols stands for control plots and red symbols for treated plots; points for oak, circles for beech and asterisks for Scots pine). (Number of reflectance spectra used in PRI calculation is of about 5000 samples per species and treatment).*

## **4.2. Canopy physiological and optical responses to PPFD variations**

The canopy ecophysiological responses to environmental factors were described for each measurement campaign using daily light curves. These curves are presented for the entire experimental period (Fig. 4.a). For days between measurement campaigns, the LUE versus PPFD relationship were interpolated following the procedure described in the Materials and Methods section (Eq. 6).

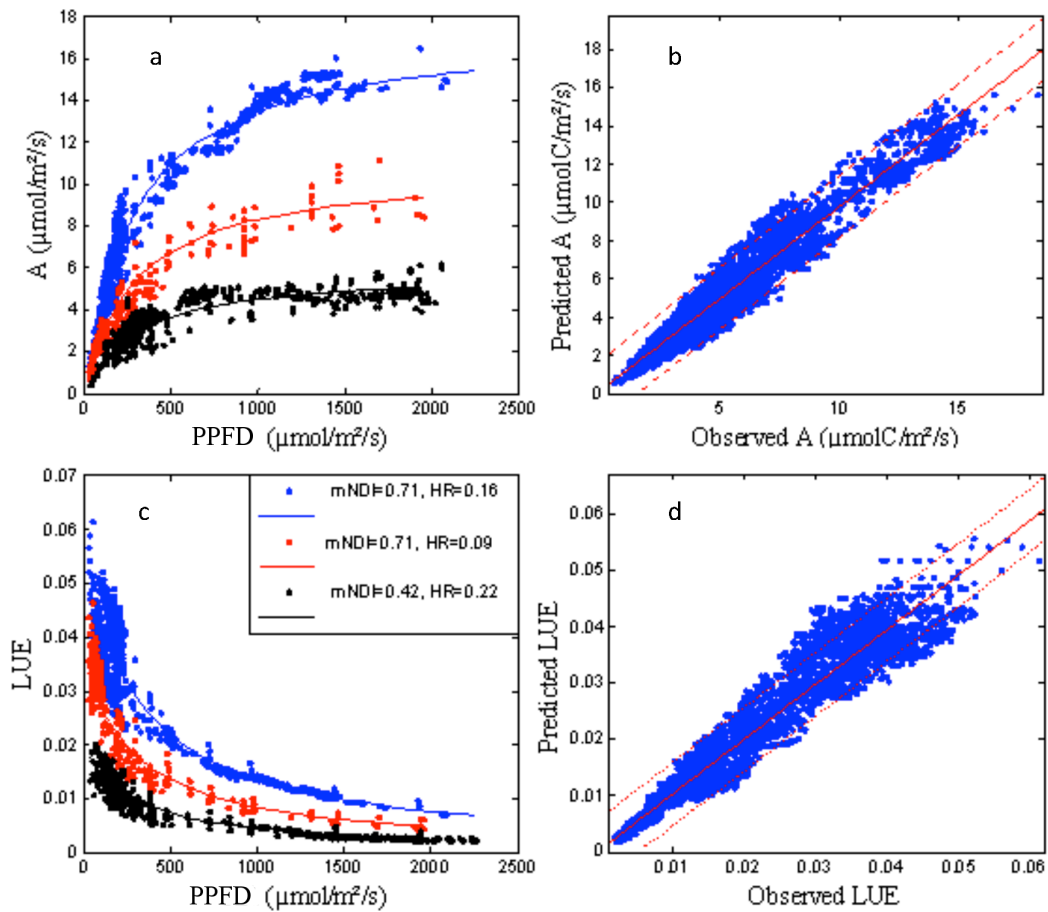


Figure 4. (a) Examples of A versus photosynthetic photon flux density (PPFD) measurements (dots) and model (line) and (b) observed versus predicted. (c) Examples of light-use efficiency (LUE) versus PPFD relationships [measurements (dots) and model (line)]. (d) Observed versus predicted LUE. Three different series over beech planter boxes are represented, covering a wide range of modified red-edge normalized difference index ( $mNDI_{705}$ ) and soil moisture content. ( $R^2$  range from 0.67 to 0.98 for LUE versus PPFD)

The daily PRI versus PPFD light curves were fitted as described in the Material and Methods section (Eq.4). These relationships are illustrated in Fig.5. The distribution of the residuals was checked, and outliers outside two standard deviations (15% of the entire dataset,  $N=4457$ ) were excluded from the following analyses.

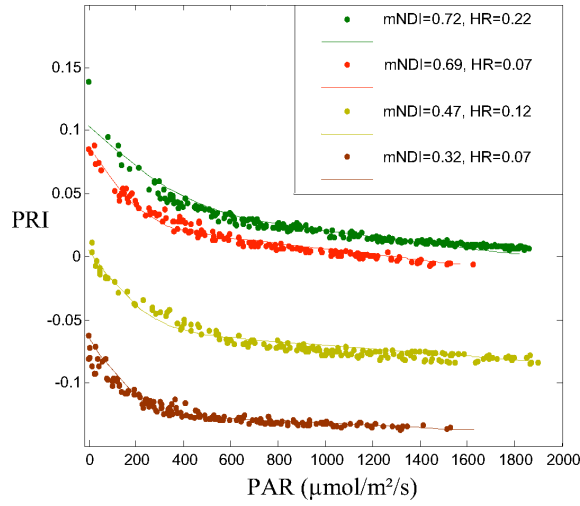


Figure 5. Examples of daily fitted photochemical reflectance index (PRI) light curves under varying soil moisture content and leaf modified red-edge normalized difference index ( $mNDI_{705}$ ).

### 4.3. Analysis of the PRI versus PPFD relationship

The estimated parameters (i.e., the  $PRI_0$ , PRI range and saturating PPFD) of Eq. 4, which express the daily variability in the PRI (Fig. 5), were analyzed using simple linear regressions of NDVI,  $mNDI_{705}$  and the soil moisture content. The results of the regressions are presented in Table 1 for all species and treatments.

	$PRI_0$	PRI range	Saturating PPFD
NDVI	$R^2=0.1, P<0.08$	$R^2=0.02, P<0.37$	$R^2=0.01, P<0.42$
$mNDI_{705}$	$R^2=0.92, P<0.001$	$R^2=0.04, P<0.17$	$R^2=0.03, P<0.33$
Soil moisture content	$R^2=0.02, P<0.22$	$R^2=0.02, P<0.34$	$R^2=0.88, P<0.001$

Table 1: Simple linear regression goodness of fit ( $R^2$  and  $P$ -value) using the NDVI,  $mNDI_{705}$  and soil moisture content as explanatory variables (lines) of the  $PRI_0$ , PRI range and saturating PPFD (columns). The data were pooled across species and treatments.

The NDVI was not linearly correlated with any of the estimated parameters, whereas the  $mNDI_{705}$  was a good estimator for the  $PRI_0$ , and the soil moisture content was correlated with the saturating PPFD. However, the PRI range was not correlated with any of the tested variables and exhibited low variability over the entire experimental period (mean value =

0.072, standard deviation = 0.0056). The relationships between these variables are shown in Fig.6.

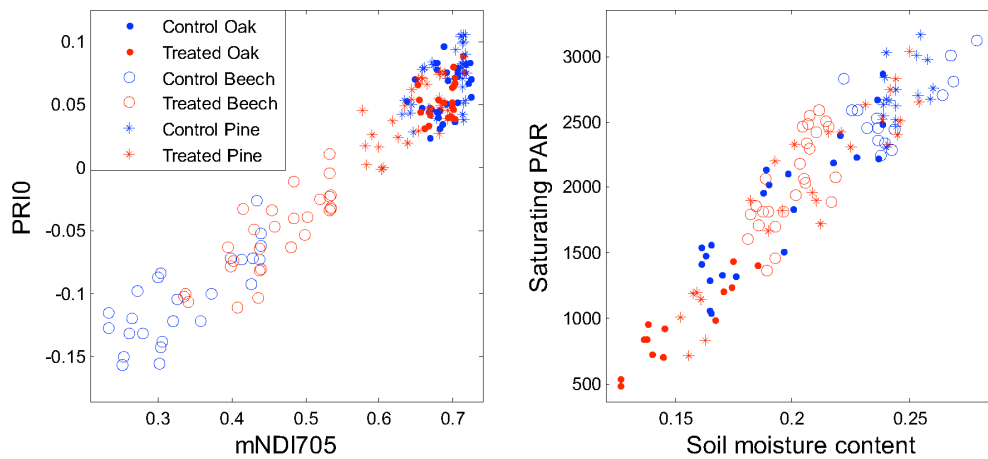


Figure 6. Relationships between  $PRI_0$  and modified red-edge normalized difference index ( $mNDI_{705}$ ) (left) and between the saturating photosynthetic photon flux density (PPFD) and soil moisture content (blue symbols for control plots and red symbols for treated plots; points for oak, empty circles for beech and asterisks for pine plots).

The  $PRI_0$  and saturating PPFD were linearly correlated with the  $mNDI_{705}$  and soil moisture content (Fig. 6). Consequently, the PRI model (Eq. 4) described in the Materials and Methods section for use on a daily scale was modified to generate a generic model at a seasonal scale according to Eq. 5 by replacing the two constants ( $PRI_0$  and saturating PPFD) with their expressions as linear functions of  $mNDI_{705}$  and soil moisture content, respectively. The range of daily PRI variability (Eq. 5) was kept as a constant in the generic model. This generic model allows the expression of the PRI as a continuous function of the PPFD, soil moisture content and  $mNDI_{705}$ . The expression of the generic model is given by Eq. 5. The regression statistics for each species and the entire dataset are summarized in Table 2.

	Oak	Beech	Pine	Whole dataset
R <sup>2</sup>	0.84	0.94	0.85	0.98
RMSE	0.0095	0.0098	0.0097	0.0058
RMSE/daily range	12.5%	16.4%	12.9%	6.9%

Table 2: Goodness of fit of the PRI regression for the PPF, soil moisture content and  $mNDI_{705}$  for each species and the entire dataset. The RMSE/daily range corresponds to the ratio between the RMSE and parameter “c” in Eq. 5.

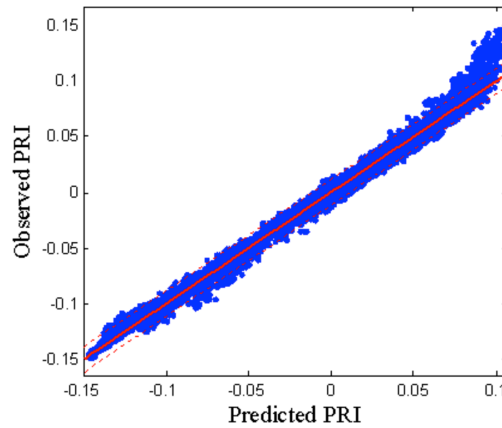


Figure 7. Measured versus predicted photochemical reflectance index (PRI) over the whole experiment period using the generic model (Eqn. 5) applied on the whole dataset (without distinction between neither species nor treatments).

There were no significant species differences in the parameters.

The parameters of this generic model were estimated using the entire dataset over the full experimental period for all species and treatments. The measured versus predicted PRI relationships are shown in Fig.7.

The model R<sup>2</sup> for all data (N=19412) was 0.97, and the model RMSE was 0.0058, which accounted for 6.9% of the estimated daily PRI range.



#### 4.4. Deconvolution of the PRI variability

The effects of the pigment content were disentangled by expressing the  $PRI_0$  as a linear function of the  $mNDI_{705}$  in the generic model, and by subtracting from the simulated and measured PRI to obtain the  $PRI_c$  (the corrected PRI). The temporal patterns of the simulated PRI,  $PRI_c$  and LUE for the full range of PPFD values are shown in Fig. 8.

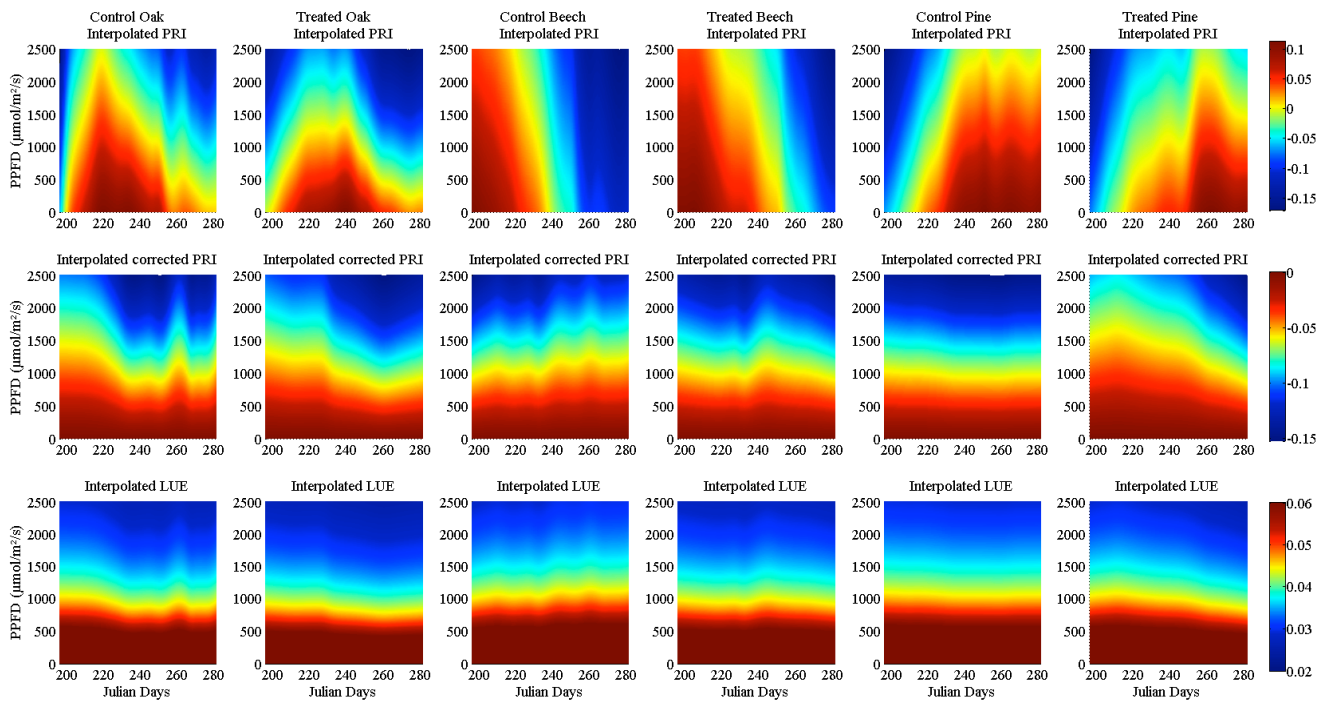


Figure 8. Surface plots of photochemical reflectance index (PRI) from the generic model Eq.5 (upper line), corrected PRI ( $PRI_c$ ) after subtracting  $PRI_0$  (middle) and light-use efficiency (LUE) (bottom line) for each experimental plot, over the full range of photosynthetic photon flux density (PPFD) and the whole experiment duration.

Different patterns were evident between the species and treatments, as shown in Fig.8. After correction, the  $PRI_c$  and LUE patterns were similar. This finding indicated that most of the seasonal PRI pattern was explained by the leaf pigment content, and that a residual component depended on the physiological functioning of the canopy, especially for beech and pine.

The relationships between the PRI,  $PRI_c$  and LUE are shown in Fig.9.

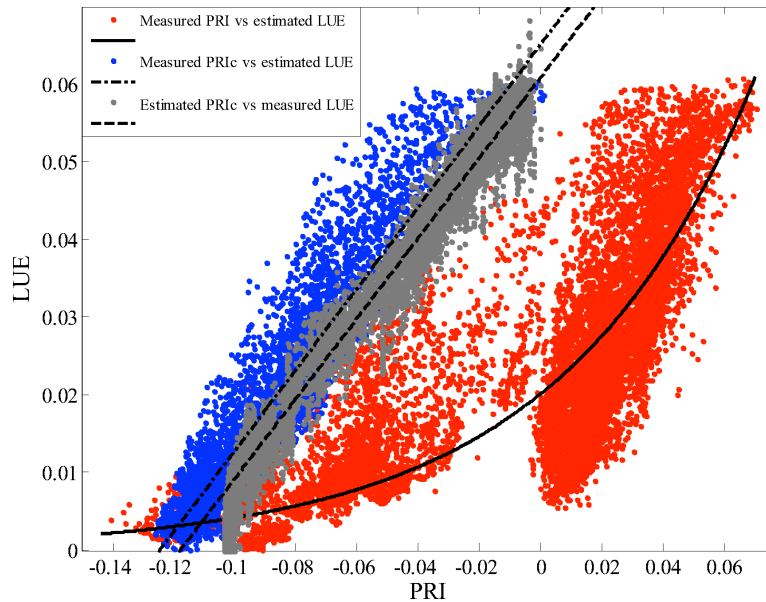


Figure 9. Photochemical reflectance index (PRI), measured and estimated PRI<sub>c</sub> versus measured and estimated light-use efficiency (LUE) from Day of Year (DoY) 197 to 250. Red symbols stand for uncorrected measured PRI versus estimated LUE (in oak, beech and pine) at canopy scale; blue symbols stand for measured PRI corrected after subtraction of PRI<sub>0</sub> versus estimated LUE (in oak, beech and pine) at canopy scale. Gray symbols stand for estimated corrected PRI versus measured LUE at leaf scale for oak and beech.

The measured PRI exhibited two distinct clouds of data points; the upper cloud contained data that were acquired from the oak and pine planter boxes and the lower cloud contained data that were acquired from the beech planter box (Fig.9). Although the PRI and LUE were exponentially related ( $R^2=0.66$ ,  $P<0.001$ ,  $RMSE=0.009$ ), residuals were not uniformly distributed ( $P<0.001$ ). In contrast, the measured PRI<sub>c</sub> and estimated LUE at the canopy scale were highly correlated ( $R^2=0.93$ ,  $P<0.001$ ,  $RMSE=0.0037$ ), and the residuals were normally distributed ( $P>0.22$ ). The estimated PRI<sub>c</sub> and measured LUE in the oak and beech at the leaf scale exhibited a similar linear relationship ( $R^2=0.95$ ,  $P<0.001$ ,  $RMSE=0.0045$ , no significant difference in slope). The slight difference in the intercepts of the canopy- and leaf-scale relationships potentially resulted from differences in the PRI<sub>0</sub> versus mNDI<sub>705</sub>. The relationship between the PRI<sub>c</sub> and LUE did not depend on species or treatment.

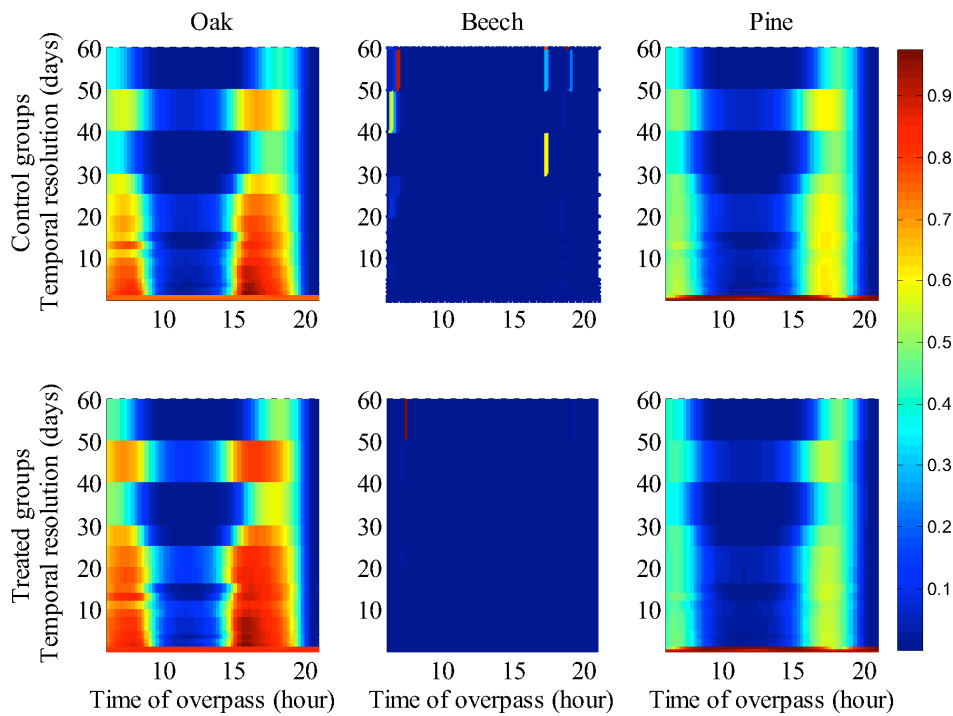


Figure 10. Ratio of simulated photochemical reflectance index (PRI) variance explained by PRIC over the DoY 195 to 280 period for each planter box. Simulations were performed using the PRI continuous model over several temporal resolution and measurement timing.

The percent of PRI variability that was explained by changes in the xanthophyll cycle are shown in Fig. 10 for each planter box for several sampling times and temporal resolutions obtained using sub-samples of PRI measurements. In oak and pine, which exhibited low  $mNDI_{705}$  variability over the growing season, the proportion of simulated PRI variability due to the facultative component was higher during the early morning (between 7 and 9 AM) and afternoon (between 15 and 19 PM) and decreased rapidly as the temporal resolution increased. Between 9 AM and 15 PM, a temporal resolution of less than 30 minutes was needed for the facultative PRI variability to reach more than 50% of the simulated variability. In beech, most of the PRI variability resulted from the constitutive variability at a temporal resolution of more than 30 minutes for each tested sampling hour.

## 5. Discussion

Six experimental plots containing saplings from three different species (oak, beech and pine) were subjected to two different water treatments, which resulted in different seasonal trends in the soil water contents between the treatments (as shown in Fig. 1). The experiment spanned from the end of a sharp increase in the NDVI (due to green-up) to the beginning of a sharp decrease in the NDVI (due to leaf senescence of the deciduous species). In the pine plots, the NDVI showed a continuous increase due to green-up before a slight decrease, which likely resulted from the lower branch needle flushing that was observed in mid-summer. Small differences in the NDVI between the control and treated plots are evident in the deciduous species (Fig. 1.b).

The  $mNDI_{705}$ , which is used as a proxy for the leaf chlorophyll content (Sims et al. 2002), exhibited different patterns between species and small differences between the control and treated plots (Fig. 1.c). This observation agrees with the observations of Damesin et al. 2003, which indicated that the leaf chlorophyll concentration per area increased sharply in beech at the beginning of budburst and then decreased. In pine, the steady increase in the  $mNDI_{705}$  can be explained by the formation of new cohorts of needles. Differences in the trends between the  $mNDI_{705}$  and NDVI suggest that these two indices provided different information during the experiment.

The measured leaf LUE exhibited a slight seasonal pattern (Fig. 2) that cannot be explained solely by the soil water content, LAI or  $mNDI_{705}$ . This pattern was similar for both deciduous species (oak and beech) and was mostly explained by the variations in the PPFD. The variability in the daily LUE was of the same order of magnitude as the seasonal variability.

The measured LUE decreased with increasing PPFD before exhibiting an asymptotic pattern at high PPFD values. The saturating PPFD value varied with the DoY based on the leaf chlorophyll and soil water content, as reported in Ogaya et al. 2003 and Xu et al. 2003. The

seasonal variability, which was linked to the leaf chlorophyll and soil moisture contents, and the daily variability, which was driven by PPFD, were accurately reproduced (Fig. 4).

The measured PRI exhibited high daily variability and strong seasonal patterns that differed between the species (Fig. 3). Although the oak and pine measurements did not differ significantly regarding their PRI level or PRI seasonal dynamics, the beech PRI was significantly lower throughout the experiment. While these seasonal trends and the differences between species cannot be compared with those observed in the LUE (Fig.2), they are similar to those observed in the  $mNDI_{705}$  (Fig.1.c). These results are comparable to those shown at the leaf scale by Hmimina et al. 2013, and suggest a strong sensitivity of the PRI to leaf pigment content, as shown by Moran et al. 2000, Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012 and Gamon and Berry 2012. To determine the impacts of this sensitivity, the variability of the PRI associated with the leaf pigment and LUE must be disentangled.

The PRI measurements were fitted on a daily basis for each plot. The model described in the Materials and Method section provides three biologically relevant parameters, the  $PRI_0$  (as defined in Hmimina et al. 2013), the maximum daily PRI range, and the saturating PPFD value. The PRI range exhibited very low seasonal variability, which can be explained by an absence of a noticeable change in the total xanthophyll pool size (data not shown) in accordance with Gamon and Surfus 1999. The saturating PPFD value was highly correlated with the soil water content, while the  $PRI_0$  was highly correlated with the  $mNDI_{705}$ . Thus, the two following distinct components of PRI variability at the leaf scale are distinguished (Gamon and Berry 2012; Hmimina et al. 2013).

- A physiological component explained at the daily scale by the PPFD and at the seasonal scale by the variability in the soil moisture content.
- A structural component explained at the seasonal scale by the  $mNDI_{705}$ , which was used as a proxy for the chlorophyll content.

Because the relationships between the  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$  at the canopy scale and between the saturating PPFD and soil moisture contents were strong and linear between the different species and treatments, a generic PRI model was designed to integrate these variables and was fitted to each species and the entire dataset (Table 2). The parameters of this generic model, which related the  $mNDI_{705}$  and soil moisture content to the  $PRI_0$  and saturating PPFD, respectively, did not differ significantly from those obtained using specific models. Therefore, the generic model can be used to deconvolve the PRI variability that is associated with the physiological response to PPFD from the variability associated with the leaf chlorophyll content over the entire experiment.

The temporal variability in the PPFD versus PRI, PPFD versus  $PRI_c$  and PPFD versus LUE relationships (Fig.8) exhibited strong discrepancies between the PRI and LUE, which could be alleviated by subtracting the estimated  $PRI_0$ . We concluded that the PRI would not be an accurate proxy of LUE without correcting for seasonally changing canopy pigment content. Indeed, variability in the canopy chlorophyll content may lead to non-functional relationships when the chlorophyll content coincidentally matches the seasonal pattern of LUE.

This strong sensitivity of the PRI versus LUE relationship to leaf pigment content may explain the observed variability in the strength of the PRI versus LUE relationships between the sites and across the different temporal resolution scales as shown in Grace et al. (2007) and Garbulsky et al. (2011). Spatial and temporal changes in the leaf pigment content may mask the physiologically-related PRI variability, and this effect may be amplified at low temporal resolution measurements (high variability in the leaf pigment content between observations) and high PPFD (low LUE variability).

In fact, while the relationships between the  $PRI_c$  and the LUE (Fig.9) were strong and unique across all plots, the relationship between the PRI and LUE was poor and non-linear. This poor PRI versus LUE relationship mainly resulted from the strong  $PRI_0$  variability in beech and the

differences in the  $PRI_0$  levels between the species. Moreover, the PRI versus LUE relationship exhibited a non-linear pattern that was similar to previously reported patterns (Garbulsky et al. 2011), while the  $PRI_c$  versus LUE relationship was clearly linear. Thus, the non-linearity of the PRI versus LUE relationship that was reported in Garbulsky et al. 2011 for deciduous species (Nichol et al. 2000, Nakaji et al. 2008) and combined sites may result from the shift in the PRI versus LUE relationship due to changes in the leaf pigment content.

The impacts of this shift on the PRI variability, which were simulated for different temporal resolutions and measurement times (Fig.10), were highly dependent on canopy phenology. In oak and pine, which exhibited low variability in the canopy chlorophyll content during the growing season, the PRI facultative variability was masked by its constitutive variability for measurements made between 9 AM and 3 PM. In beech, which exhibited high variability in the canopy chlorophyll content, the PRI facultative variability only exceeded the constitutive variability at low temporal resolution (<30 minutes).

## **6. Conclusions**

In agreement with previous studies at the leaf scale, the PRI was shown to be a composite index that varied with the LUE (facultative variability) and leaf pigment content (constitutive variability). The PRI exhibited seasonal patterns that differed from those of the measured LUE. While the LUE appeared to be driven mainly by the PPFD at the seasonal scale, the PRI dynamics differed significantly between the species and exhibited features similar to the pattern of the canopy pigment content.

The high temporal resolution and high dynamic range of the setup described in this work allowed us to describe the PRI changes under a broad range of PPFD values. Thus, the  $PRI_0$  was precisely estimated and could be related to the  $mNDI_{705}$ , which was used as an indicator of variations in leaf pigment content. Moreover, the range of daily PRI variation and

the PRI facultative change were shown to be constant in each species and treatment, and the saturation PPFD was correlated with the soil water content.

This description of the PRI variability enabled us to design a continuous seasonal scale model that was able to accurately reproduce the seasonal variability of the PRI. The continuous PRI model was used to interpolate the PRI measurements to describe the PPFD and pigment-related temporal patterns and to disentangle the constitutive and facultative PRI variability. The obtained  $PRI_c$ , which was calculated as the measured PRI minus the estimated  $PRI_0$ , was highly correlated with the interpolated LUE. During the growing season, and while excluding sources of significant changes in the LAI, high temporal resolution PRI measurements were shown to provide an estimate of the overall canopy pigment content ( $PRI_0$ ) and LUE ( $PRI_c$ ). Moreover, while the relationship between the  $PRI_c$  and LUE was clearly linear, the relationship between the mostly pigment-related PRI and LUE was exponential (as reported in previous studies). Thus, the observed PRI versus LUE relationship may be strongly affected by the temporal and spatial variations of the LAI and leaf pigment content. The direct use of the PRI as LUE proxy at large scales (in a remote sensing context) may lead to inaccurate LUE estimations due to the dominant effect of canopy pigment content on PRI.

The described continuous model may be applicable over broader scales, but requires the use of water availability and of a reliable proxy of canopy pigment content. The described daily-scale PRI light-curve analysis may be used to provide a coarser estimation of the  $PRI_0$ , but requires a high temporal resolution and reliable PRI measurements under low light conditions. The proportion of the PRI variability associated with changes in the xanthophyll pigment concentration which could be observed in several sub-samples decreased rapidly with the temporal resolution of the measurements and was dependent on the timing of the measures. At coarse temporal resolution and around midday, when photosynthesis is light-saturated, PRI variability is mainly explained by seasonal changes in canopy pigment content.



Moreover, while these methods were shown to deconvolve the LUE and pigment-related PRI variability, the effects of different and varying canopy structures were not assessed in this work.

The potential of the PRI as a proxy for LUE before and after deconvolution should be assessed over broader temporal and spatial scales, across forests that exhibit different structural properties, and under varying climatic constraints. In this context, linking PRI measurements with carbon flux sampling appears to be the next step in order to improve our understanding of PRI variability at canopy scale.

# Liste des figures

## CHAPITRE I

Fig.1 : La lumière incidente (I) arrivant sur une feuille peut être réfléchiée (R), absorbée (A) ou transmise (T). **p.19**

Fig.2 : Schéma simplifié de l'absorption d'un photon ( $h\nu$ ) par une molécule de chlorophylle de l'antenne collectrice, et de sa transmission jusqu'au centre réactionnel du photosystème II. Le centre réactionnel perd un électron qui va rejoindre son accepteur primaire (phéophytine) avant d'entrer dans la chaîne de transport d'électron. **p.21**

Fig.3 : Schéma simplifié du trajet des protons et des électrons lors de la photosynthèse au sein de la membrane thylacoïdale d'une feuille (d'après Zaks et al., 2012). **p.21**

Fig. 4 : Schéma simplifié distinguant les trois étapes du cycle de Calvin : la fixation du carbone grâce à la RubisCO, la réduction du carbone pour la synthèse des glucides, et la régénération du substrat RuBP pour un nouveau cycle. **p.23**

Fig. 5 : Schéma du fonctionnement de la phase non-photochimique de la photosynthèse pour les plantes au métabolisme en C3, C4 et CAM. **p.23**

Fig. 6 : Schéma des différentes variables mesurables par fluorescence en fonction de l'état d'adaptation à la lumière de la feuille étudiée. **p.26**

Fig. 7 : Florescence chlorophyllienne induite par le soleil (SIF) et spectres de réflectance d'une feuille. (A) Spectre de la feuille entre 650 et 800 nm avec les deux pics de fluorescence dans les bandes d'absorption de l'oxygène atmosphérique à 680 et 760 nm. (B) Mise en évidence de la fluorescence chlorophyllienne dans les bandes d'absorption de l'oxygène (d'après Meroni et al. 2009). **p.28**

Fig. 8 : Schéma de la conversion de la violanxanthine en anthéranxanthine et en zéaxanthine dans les thylakoides via le cycle des xanthophylles en réponse à un excès de lumière. **p.29**

Fig. 9 : Schéma général des processus de dissipation de l'énergie lumineuse par les plantes (modifié à partir de Zaks et al., 2012). **p.30**

Fig. 10 : spectres de réflectance et de transmittance d'une feuille de hêtre commun. **p.35**

Fig. 11 : (a) - Série temporelle des spectres de réflectance mesurés sur la même feuille sous un PAR qui augmente puis qui diminue. L'insert permet d'agrandir la zone autour de 550 nm. (b)- Dynamique du PRI (en noir) et du rendement de la fluorescence (en rouge) en réponse à la séquence de PAR imposée (en bleu,  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), issue de la même série que (a) (Hmimina et al., 2013). **p.38**

Fig. 12 : Relation entre PRI et rendement photochimique effectif de fluorescence d'une part (sur des feuilles de lumières de 15 espèces ayant grandi en conditions de lumière et de nutrition optimales), et le taux net de  $\text{CO}_2$  utilisé par des feuilles de lumière d'autre part (d'après Gamon et al., 1997). **p.38**

Fig. 13 : (a) Coefficient de détermination de la relation entre LUE (light use efficiency) et PRI (photochemical reflectance index) pour différentes échelles d'études. Les barres de dispersion représentent les erreurs standards (n=24 études pour les feuilles, n=22 études pour les canopées et n=7 études pour les écosystèmes) d'après Garbulsky et al., 2011. (b) Exemples de relation entre LUE et PRI à l'échelle de l'écosystème sur une année pour différents types de forêts : une forêt de résineux méditerranéenne (triangle), une plantation d'Eucalyptus (cercle), une forêt de décidus méditerranéenne (carré) et une forêt sempervirente subtropicale (cercle noir) d'après Garbulsky et al. 2010. **p.40**

Fig. 14 : Le système expérimentale constitué de 3 espèces (chêne pédonculé, hêtre et pin sylvestre) chacune étant répartie dans 2 bacs distincts afin d'introduire un contraste de contenu en eau dans au sein de chaque espèce. **p.49**

Fig. 15 : Le système expérimental composé de : une fibre optique située au dessus de chaque bac permettant de mesure la lumière réfléchié par les bacs ; une fibre optique située au

dessus d'une référence spectralon permettant de mesurer la lumière incidente ; un multiplexer à 16 entrées relié à un spectrophotomètre ; un ordinateur. **p.49**

Fig. 16 : Plateforme de l'écotron composée de plusieurs écolab, chaque écolab est composé de 3 cellules. **p.53**

Fig. 17 : Schéma du système expérimental réalisé afin d'injecter de l'ozone dans une cellule de l'Ecolab. **p.54**

Fig. 18: Design expérimentale : Un clip de feuille pour mesurer la fluorescence chlorophyllienne couplé à un système de mesure optique avec la même zone de mesure : Pour une mesure de référence (spectralon), une mesure de feuille et pendant la mesure d'une cinétique sur une feuille. **p.56**

Fig. 19 : Design temporel des traitements échantillonnés pour chaque cellule. RH concerne le traitement lié au stress hydrique atmosphérique, OZ concerne le traitement lié à l'ozone, RH\_OZ concerne le traitement avec les pots qui subissent un stress OZ après un stress RH et OZ\_RH concerne le traitement avec les pots qui subissent un stress RH après un stress OZ. **p.57**

Fig. 20 : Photo des installations situées sur la tour à flux de Barbeau. **p.58**

## CHAPITRE II

Fig. 1: The experimental design: (a) – the steel pipe greenhouse with the optic fiber above each planter box (6 planter boxes composed of three species (oak, beech, and scots pine) under two water conditions); (b) – the optical multiplexer with 16 input ports (6 for above canopy optical measurements, 1 for the reference spectralon panel and the remaining inputs for dark noise measurement); and (c) – optical fiber above the reference spectralon panel. **p.71**

Fig. 2: (a). Dynamics of soil water content measured at a depth of 30 cm for each of the 6 planter boxes. (b). Temporal dynamics of the canopy structure based on the fraction of absorbed photosynthetically active radiation (faPAR) for each of the 6 planter boxes.

Blue denotes the pine plots; red denotes the oak plots; black denotes the beech plots; solid lines denote the control plots; and thin dotted lines denote the treatment plots. **p.77**

Fig. 3: Relationship between canopy  $mNDI_{705}$  and measured leaf chlorophyll content (mg/g) for pooled oak and beech species. (Red circles indicate sunlit leaves and blue triangles indicate shaded leaves). **p.78**

Fig. 4: Dynamics of canopy  $mNDI_{705}$  and leaf chlorophyll content in mg/g. (Histograms of chlorophyll content: blue indicates shaded leaves; red indicates sunlit leaves; green indicates needles; black lines indicate the moving median  $mNDI_{705}$ ; and shaded areas indicate the 95% tolerance intervals). **p.79**

Fig. 5: (a). Dynamics of canopy xanthophyll pigment (violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin in nmol/g dry matter; blue indicates shaded leaves and red indicates sunlit leaves; mean and standard error of mean). (b). Relationship between the chlorophyll content (mg/g) and violaxanthin content (nmol/g dry matter). (c). Relationship between the chlorophyll content (mg/g) and xanthophyll content, including violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin and lutein (nmol/g dry matter). **p.81**

Fig. 6: Temporal dynamics of PRI throughout the experiment for the three species (blue full circle denotes the canopy PRI; black continuous line denotes the moving median PRI; shaded area denotes the 95% tolerance intervals). **p.82**

Fig. 7: Intra-daily variations of PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , in blue) and canopy PRI (in black) between 8 AM and 8 PM (left - control pine at DOY 107; right - treatment oak at DOY 98). **p.83**

Fig. 8: Fitted canopy PRI versus incident photosynthetically active radiation (PAR –  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) for the control pine plot on different days (blue denotes DOY 106, green denotes DOY 117, red denotes DOY 216 and black denotes DOY 220). **p.84**

Fig. 9: The temporal dynamics of  $PRI_0$  and  $PAR_{\text{sat}}$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) during the growing season (control plots in blue and treatment plots in red). **p.84**

Fig. 10: (a) - Relationships between  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$ , - Relationships between (b)  $PAR_{sat}$  and  $mNDI_{705}$  and (c)  $PAR_{sat}$  and soil moisture (control plots shown in blue and treatment plots shown in red; points denote oak, empty circles denote beech, and stars denote pine plots). **p.87**

Fig. 11: Relative importance of the canopy chlorophyll content and soil moisture content for the variability of  $PAR_{sat}$  throughout the experiment, from spring budburst to autumn senescence (green circles indicate canopy chlorophyll content and blue circles indicate soil moisture content). **p.88**

### CHAPITRE III

Fig. 1: Experimental design: a leaf clip was used to acquire the fluorescence measurements as well as the spectral measurements, and the same field of view was used: above a reference spectralon panel, above a sampled leaf and during the kinetics display on a leaf. **p.105**

Fig. 2: Temporal design of the cells sampled for each treatment. RH indicates the atmospheric water stress treatment, OZ indicates the ozone treatment, RH\_OZ indicates the plots in the OZ treatment after undergoing the RH treatment and OZ\_RH indicates the plots in the RH treatment after undergoing the OZ treatment. **p.106**

Fig. 3: Relationship between  $mNDI_{705}$  and chlorophyll content ( $mg/m^2$ ) for both species (Q. robur in blue and Q. ilex in green). **p.110**

Fig. 4: (a) Relationship between the  $PRI_0$  and  $mNDI_{705}$  and (b) relationship between the  $PRI_0$  and (Fm-Fo) for both species (Q. robur in blue and Q. ilex in green). **p.110**

Fig. 5: Dynamics of the (a) chlorophyll content ( $mg/m^2$ ) and (b)  $PRI_0$  for the entire experiment. RH represents the atmospheric water stress treatment and OZ represents the ozone treatment; dots in blue (Q. robur), green (Q. ilex) and red represent the combined RH-OZ treatment (atmospheric water deficit treatment followed by ozone treatment and vice-versa). **p.112**

Fig. 6: Relationships between the quantum yield of photochemistry  $Y(II)$ , active non photochemical quenching  $Y(NPQ)$ , passive non-photochemical quenching  $Y(NO)$ , PRI and  $PRI_c$  (PRI corrected). Blue points are *Q. robur* species and green points are *Q. ilex* species. **p.115**

#### CHAPITRE IV

Fig.1: Seasonal variations in 2015 of NDVI measured every half-hour above the deciduous forest canopy of Fontainebleau-Barbeau flux-tower site. The data were acquired between 8 h and 18 h TU. The tree growth cessation occurred between red lines (DOY 174 to DOY 196), and the studied period is between black lines (DOY 150 to DOY 210). **p.132**

Fig.2: Variations of temperature ( $^{\circ}C$ ), vapour pressure deficit (VPD, kPa), photosynthetically active radiation (PAR), soil water content (SWC at 1500 cm of depth,  $cm^3/cm^3$ , left axis) and precipitation (mm, right axis), evapotranspiration (ETR, mm), mean tree growth (mm), gross primary production (GGP), light use efficiency (LUE) and PRI. Measurements are acquired every half-hour above the canopy from DOY 150 to DOY 210, and every minutes for the PRI. The data presented were acquired between 8 h and 18 h TU. Data measured are in light blue and the means are in dark blue. **p.135**

Fig.3: Boxplot of PRI for six weeks, from DOY 161 to DOY 203. The central red line is the median, the blue edges of the box are the 25th and 75th percentiles, the whiskers extend to the data points not considered outliers (in black), outliers are plotted individually (in red). **p.136**

Fig.4: Dynamics of  $mNDI_{705}$ ,  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  calculated from measurements acquired above the canopy. For  $mNDI_{705}$ , data measured with the spectrophotometer are in light blue and the means are in dark blue. **p.137**

Fig.5: Relationship between SWC (mm) and  $PAR_{sat}$  from the DOY 150 to 210. **p.137**

Fig.6: left: Relationship between PRI and LUE from the DOY 150 to 210 and right: relationship between PRIC and LUE (PRIC calculated during the tree growth cessation are in red and the PRIC for the period before and after the drought are in blue). **p.138**



# Liste des Tables

## CHAPITRE II

Table 1: Summary statistics of the xanthophyll content (nmol/g dry matter) and chlorophyll content (mg/g dry matter) of oak and beech species (mean (standard error), min – max).

**p.81**

Table 2. Goodness of the  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  regressions for  $mNDI_{705}$  and the soil moisture contents for the entire dataset (estimate value (standard error); \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.001$ , respectively). **p.85**

## CHAPITRE III

Table 1: Summary of the regression for  $mNDI_{705}$ ,  $Fo$ ,  $Fm$  and  $Fm-Fo$  on  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  for the entire dataset ( $R^2$ ; \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.001$ , respectively). **p.111**

Table 2: Relationships of the AOT40 (ppb) and EA (mm) with the  $PRI_0$  and  $PAR_{sat}$  for *Q. robur* and *Q. ilex* in the 5 treatments. The significance of the predictors is \*, \*\* and \*\*\*, which indicates significant effects at  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.001$ , respectively. Estimates of coefficients with standard error. Control represents the control plants, RH represents atmospheric water deficit treatment, OZ represents the ozone treatment, RH\_OZ represents the plots in OZ treatment after undergoing RH treatment and OZ\_RH represents the plots in RH treatment after undergoing OZ treatment. Sample size: number of observations (leaves). RMSE: root mean square error. **p.114**

## CHAPITRE IV

Table 1: Summary of the regression between Soil water content (SWC in mm) and  $PAR_{sat}$  for the period between DOY 150 and DOY 210 ( $R^2$ ; \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects at  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.001$ , respectively). **p.138**

# Références

## A

- Abdel-Aal E.S. M., Young J.C., Wood P.J., Rabalski I., Hucl P., Fregeau-Reid J. 2002. Einkorn: A potential candidate for developing high lutein wheat. *Cereal Chemistry*, 79, 455–457.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2297–2306.
- Alegre L. & Munne S. 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925-31. DOI : 10.1007/s004250050699
- Alton PB, North PR, Los SO. 2007. The impact of diffuse sunlight on canopy light-use efficiency, gross photosynthetic product and net ecosystem exchange in three forest biomes. *Global Change Biology* 13, 776–787.
- Anav a., Ruti PM, Artale V, Valentini R. 2010. Modelling the effects of land-cover changes on surface climate in the Mediterranean region. *Climate Research* 41, 91–104.
- Aparicio-Ruiz R., Riedl K.M., Schwartz S.J. 2011. Identification and quantification of metallo-chlorophyll complexes in bright green table olives by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry quadrupole/time-of-flight. *J Agric Food Chem* 59 (20)
- Aparicio N., Villegas D., Casadesus J., Royo C. 1999. Aparicio et al. - 1999 - Spectral Vegetation Indices as Nondestructive Tools for Determining Durum Wheat Yield. 91, 83–91.

Asner G.P. 1998. Biophysical and biochemical sources of variability in canopy reflectance, *Remote Sens. Environ.* 64, 234–253. doi:10.1016/S0034-4257(98)00014-5.

## B

Bagard M., Le Thiec D., Delacote E., Hasenfratz-Sauder M.P., Banvoy J., Gérard J., Dizengremel P., Jolivet Y. 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum*. 134, 559-574.

Baker N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89–113

Baldocchi D.D., Valentini R., Running S., Oechel W., Dahlman R., 1996. Strategies for measuring and modelling carbon dioxide and water vapour fluxes over terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 2, 159 – 168.

Baldocchi D., Finnigan J., Wilson K., Paw U.K.T., Falge E. 2000. On measuring net ecosystem carbon exchange over tall vegetation on complex terrain. *Boundary-Layer Meteorology* 96, 257 – 291.

Baldocchi D., Falge E., Gu L., Olson R., Hollinger D., Running S., Anthoni P., Bernhofer C.H., Davis K., Evans R., Fuentes J., Goldstein A., Katul G., Law B., Lee X., Malhi Y., Meyers T., Munger W., Oechel W., Paw U.K.T., Pilegaard K., Schmid H.P., Valentini R., Verma S., Vesala T., Wilson K., Wofsy S. 2001. FLUXNET: A new tool to study the temporal and spatial variability of ecosystem scale carbon dioxide, water vapor, and energy flux densities. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 82(11), 2415–2434. DOI: 10.1175/1520-0477(2001)082<2415:FANTTS>2.3.CO;2

- Barton C.V.M. & North P.R.J. 2001. Remote sensing of canopy light use efficiency using the photochemical reflectance index Model and sensitivity analysis. *Remote Sensing of Environment*, 78, 264–273. DOI: 10.1016/S0034-4257(01)00224-3
- Bateman K.P., Castro-Perez J., Wrona M., Shockcor J.P., Yu K., Oballa R., Nicoll-Griffith D.A. 2007. MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21
- Berendse F. 1987. Nitrogen Use Efficiency: A Biological Meaningfull Definition. *Functional Ecology*, Vol 1 no 3 293-296, 5.
- Bigras F.J., Ryyppo A., Lindstrom A., Stattin E. 2001. Cold acclimaion and deacclimation of shoots and roots of conifer seedlings. In: Bigras FJ, Colombo SJ, eds. *Conifer cold hardiness*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 57–88.
- Bino R.J., Ric de Vos C.H., Lieberman M., Hall R.D., Bovy A., Jonker H.H., Tikunov Y., Lommen A., Moco S., Levin I. (2005) The light- hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytol* 166(2):427–438.
- Björkman O. & Demmig-Adams B. 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: Schulze E-D, Caldwell M, eds. *Springer Study Edition. Ecophysiology of Photosynthesis SE-2*. Springer Berlin Heidelberg, 17–47. DOI: 10.1007/978-3-642-79354-7\_2
- Björkman O. & Demmig-Adams B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: Schulze E-D, Caldwell M, eds. *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer, 17–47.
- Brodersen C.R., Vogelmann T.C., Williams W.E., Gorton H.L. 2008. A new paradigm in leaflevel photosynthesis: direct and diffuse lights are not equal. *Plant, cell & environment* 31, 159–64.
- Busch F., Hüner N.P.A., Ensminger I. 2009. Biochemical constrains limit the potential of the photochemical reflectance index as a predictor of effective quantum efficiency of

photosynthesis during the winter spring transition in Jack pine seedlings. *Functional Plant Biology* 36 , 1016–1026.

Butler W.L. 1978. Energy distribution in photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29: 345–378.

## C

Cano M.P. HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 1786-1791.

Carnicer J., Coll M., Ninyerola M., Pons X., Sánchez G., Peñuelas J. 2011. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1474–1478.

Castagna A & Ranieri A. 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: from O<sub>3</sub> uptake to gene expression adjustment. *Environmental pollution*. 157(5), pp.1461–9.

Castro-Esau K.L., Sánchez-Azofeifa G.A., Rivard B. 2006. Comparison of spectral indices obtained using multiple spectroradiometers. *Remote Sensing of Environment* 103, 276–288.

Cerovic Z.G., Moise N., Agati G., Latouche G., Ghazlen N. B., Meyer S. 2008. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 650-654.

Cerovic Z.G., Masdoumier G., Ghazlen N.B., Latouche G. 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, 146, 251–60. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x

- Chen B.H.; Chen Y.Y. Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1315-1320.
- Cheng Y.B., Middleton E.M., Hilker T., Coops N.C., Black T.A., Krishnan P. 2007. The impact of diffuse sunlight on canopy light-use efficiency, gross photosynthetic product and net ecosystem exchange in three forest biomes. *Glob. Change Biol.* 13, 776.
- Cleveland W.S. 1979. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* 74 (368): 829–836. DOI: 10.2307/2286407.

## D

- Damesin, C., 2003. Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytologist*, 158(3), pp.465–475.
- Darvin M.E., Fluhr J.W., Meinke M.C., Zastrow L., Sterry W., Lademann J. 2011. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. *Exp Dermatol* 20 (2):125–129. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01191.x
- Demmig-Adams B., Winter K., Krüger A., Czygan F.C. 1989. Light response of CO<sub>2</sub> assimilation, dissipation of excess excitation energy, and zeaxanthin content of sun and shade leaves. *Plant Physiology*, 90, 881–886. DOI: 10.1104/pp.90.3.881
- Demmig-Adams B. & Adams W.W. 1992. Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant, Cell and Environment*, 15(4), 411–419. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb00991.x

- Demmig-Adams B. & Adams W.W., 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), 21–26. DOI: 10.1016/S1360-1385(96)80019-7
- Demmig-Adams B. & Adams W.W. 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198, 460–470. DOI: 10.1007/BF00620064
- Demmig-Adams B. 1998. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 474–482.
- Dobrowski S., Pushnik J., Zarco-Tejada P., Ustin S. 2005. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sensing of Environment*, 97, 403–414. DOI: 10.1016/j.rse.2005.05.006
- Drolet G.G., Huemmrich K.F., Hall F.G., Middleton E.M., Black T.A., Barr A.G., Margolis H.A. 2005. A MODIS-derived photochemical reflectance index to detect inter-annual variations in the photosynthetic light-use efficiency of a boreal deciduous forest. *Remote Sensing of Environment*. 98, 212–224.
- Drolet G.G., Huemmrich K.F., Middleton E.M., Hall F.G., Margolis H.A. 2008. Regional mapping of gross light-use efficiency using MODIS spectral indices. *Remote Sensing of Environment*, 112(6), pp.3064–3078.
- Dufrêne E., Davi H., François C., Le Maire G., Le Dantec V., Granier A. 2005. Modelling carbon and water cycles in a beech forest. Part I: Model description and uncertainty analysis on modeled NEE. *Ecological Modelling*, 185(2), 407–436.

## E

Ensminger I., Sveshnikov D., Campbell D. A., Funk C., Jansson S., Lloyd J., Shibistova O, Öquist G. 2004. Intermittent low temperatures constrain spring recovery of photosynthesis in boreal Scots pine forests. *Global Change Biology*, 10(6), pp.995–1008.

## F

Fagnano M., Maggio A., Fumagalli I., 2009. Crops responses to ozone in Mediterranean environments. *Environmental Pollution* 157, 1438-1444.

Falge E., Baldocchi D., Tenhunen J., Aubinet M., Bakwin P., Berbigier P., Bernhofer C., Burba G., Clement R., Davis K.J., et al. 2002. Seasonality of ecosystem respiration and gross primary production as derived from FLUXNET measurements. *Agricultural and Forest Meteorology* 113, 53–74.

Feret J.B., François C., Asner G.P., Gitelson A.A., Martin R.E., Bidet L.P.R., Ustin S.L., Le Maire G., Jacquemoud S. 2008. PROSPECT-4 and 5: Advances in the leaf optical properties model separating photosynthetic pigments, *Remote Sensing of Environment*, Volume 112, Issue 6, Pages 3030-3043

Filella I., Amaro T., Araus J. L., Peñuelas J. 1996. Relationship between photosynthetic radiation-use efficiency of Barley canopies and the photochemical reflectance index (PRI). *Physiologia Plantarum*, 96, 211–216.

Filella I., Peñuelas J., Llorens L., Estiarte M. 2004. Reflectance assessment of seasonal and annual changes in biomass and CO<sub>2</sub> uptake of a Mediterranean shrubland submitted to



experimental warming and drought. *Remote Sensing of Environment*, 90, 308–318.

DOI: 10.1016/j.rse.2004.01.010

Filella I., Porcar-Castell A., Munné-Bosch S., Bäck J., Garbalsky M.F., Peñuelas J. 2009. PRI assessment of long-term changes in carotenoids/chlorophyll ratio and short-term changes in de-epoxidation state of the xanthophyll cycle. *International Journal of Remote Sensing*, 30, 4443–4455. DOI: 10.1080/01431160802575661

Fréchette E., Wong C.Y.S., Junker L.V., Chang C.Y. 2015. Zeaxanthin-independent energy quenching and alternative electron sinks cause a decoupling of the relationship between the photochemical reflectance index ( PRI ) and photosynthesis in an evergreen conifer during spring. , 1–15.

Fu W., Magnúsdóttir M., Brynjólfson S., Pálsson B.Ø., Paglia G. 2012. UPLC-UV-MS(E) analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 3145–54. DOI: 10.1007/s00216-012-6434-4

Fuhrer J. 2009. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* 96, 1973-194.

## G

Gallé A., Haldimann P., Feller U. 2007. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytologist*, 174, 799–810. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02047.x

Gamon J.A., Field C.B., Bilger W., Björkman O., Fredeen A.L., Peñuelas J. 1990. Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia*, 85(1), pp.1–7. DOI: 10.1007/BF00317336

- Gamon J.A., Peñuelas, J., Field, C.B. 1992. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment*, 41(1), 35–44. DOI: 10.1016/0034-4257(92)90059-S
- Gamon J. A., Field C. B., Roberts D. A., Ustin S. L., Valentini, R. 1993. Functional patterns in an annual grassland during an AVIRIS overflight. *Remote Sensing of Environment*, 44, 239–253.
- Gamon J. A., Filella I., Peñuelas, J. 1993. The dynamic 531-nanometer  $\Delta$  reflectance signal: A survey of twenty angiosperm species. In H. Yamamoto, & C. Smith (Eds.), *Photosynthetic responses to the environment* (pp. 172–177). Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Gamon J.A., Serrano L., Surfus S. 1997. The photochemical reflectance index : an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 112, 492–501. DOI: 10.1007/s004420050337
- Gamon J.A. & Surfus J.S. 1999. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer, *New Phytol.* 143. 105–117. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00424.x.
- Gamon J.A. & Qiu H.L. 1999. Ecological applications of remote sensing at multiple scales. In F. I. Pugnaire, & F. Valladares (Eds.), *Handbook of functional plant ecology* (pp. 805–846). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Gamon J.A, Field C.B., Fredeen A.L., Thayer S. 2001. Assessing photosynthetic downregulation in sunflower stands with an optically-based model. *Photosynthesis Research*, 67(1-2), pp.113–125
- Gamon J.A. & Berry J.A. 2012. Facultative and constitutive pigment effects on the Photochemical Reflectance Index (PRI) in sun and shade conifer needles. *Israel Journal of Plant Sciences* 60, 85–95. DOI: 10.1560/IJPS.60.1-2.85.

- Gamon J.A. & Bond B. 2013. Effects of irradiance and photosynthetic downregulation on the photochemical reflectance index in Douglas-fir and ponderosa pine. *Remote Sensing of Environment* 135, 141–149.
- Gamon J.A., Kovalchuk O., Wong C.Y.S., Harris A., Garrity S.R. 2015. Monitoring seasonal and diurnal changes in photosynthetic pigments with automated PRI and NDVI sensors. *Biogeosciences Discussions*, 12(3), 2947–2978. DOI: 10.5194/bgd-12-2947-2015.
- Garbulsky M.F., Peñuelas J., Gamon J., Inoue Y., Filella I. 2011. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies. A review and meta-analysis. *Remote Sensing of Environment*, 115, 281–297. DOI: 10.1016/j.rse.2010.08.023
- Garrity S.R., Eitel J.U.H., Vierling L.A. 2011. Disentangling the relationships between plant pigments and the photochemical reflectance index reveals a new approach for remote estimation of carotenoid content. *Remote Sensing of Environment* 115, 628–635.
- García-Plazaola J.I., Faria T., Abadía J., Abadía A., Chaves M.M., Pereira J.S. 1997. Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1667–1674. DOI: 10.1093/jxb/48.9.1667
- García-Plazaola J.I., Becerril J.M. 2000. Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees - Structure and Function*, 14, 339–343. DOI: 10.1007/PL00009773
- Garrity S.R., Eitel J.U.H., Vierling L.A. 2011. Disentangling the relationships between plant pigments and the photochemical reflectance index reveals a new approach for remote estimation of carotenoid content. *Remote Sensing of Environment*, 115, 628–635. DOI: 10.1016/j.rse.2010.10.007

- Gastellu-Etchegorr, J. P., Martin E., Gascon F. 2004. DART: a 3D model for simulating satellite images and studying surface radiation budget. *International journal of remote sensing*, 25(1), 73-96.
- Gebremichael M, Barros AP. 2006. Evaluation of MODIS Gross Primary Productivity (GPP) in tropical monsoon regions. *Remote Sensing of Environment* 100, 150–166. DOI:10.1016/j.rse.2005.10.009
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990, 87–92.
- Genty B, Harbinson J. 1996. Regulation of Light Utilization for Photosynthetic Electron Transport. In: Baker N, ed. *Advances in Photosynthesis and Respiration. Photosynthesis and the Environment SE - 3*. Springer Netherlands, 67–99.
- Gentili A & Caretti F. 2011. Evaluation of a method based on liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry for a rapid and comprehensive characterization of the fat-soluble vitamin and carotenoid profile of selected plant foods. *J Chroma- togr A*
- Genty B., Briantais J.M., Baker N. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990 (1): 87-92.
- Ghulam A., Fishman J., Maimaitiyiming M., Wilkins J.L., Maimaitijiang M., Welsh J., Bira B., Grzovic M. 2015. Characterizing Crop Responses to Background Ozone in Open-Air Agricultural Field by Using Reflectance Spectroscopy. *Geoscience and Remote Sensing Letters, IEEE*, vol.12, no.6, pp.1307,1311. DOI: 10.1109/LGRS.2015.2397001
- Gill S.S. & Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.

- Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. 1991. Zeaxanthin Formation and Energy-Dependent Fluorescence Quenching in Pea Chloroplasts under Artificially Mediated Linear and Cyclic Electron Transport. *Plant physiology* 96, 635–43.
- Gilmore A. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99, 197–210. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03449.x
- Goerner A, Reichstein M, Rambal S. 2009. Tracking seasonal drought effects on ecosystem light use efficiency with satellite-based PRI in a Mediterranean forest. *Remote Sensing of Environment* 113, 1101–1111.
- Govindjee G., Papageorgiou G.C. 2004. Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht, 1-42.
- Goss R., Bohme K., Wilhelm C., The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata* converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanistic for the mechanism of enhanced nonphotochemical energy dissipation, *Planta* 205 (1998) 613-321.
- Grace, J., Nichol, C., Disney, M., Lewis, P., Quaife, T., & Bowyer, P. (2007). Can we measure terrestrial photosynthesis from space directly, using spectral reflectance and fluorescence? *Global Change Biology*, 13, 1484–1497
- Grace, J. et al., 2007. Can we measure terrestrial photosynthesis from space directly, using spectral reflectance and fluorescence? *Global Change Biology*, 13(7), pp.1484–1497.
- Grömping U., 2006. Relative importance for linear regression. The package relaimpo. *Journal of Statistical Software*, 17, 1-27.
- Guo J, Trotter CM. 2004. Estimating photosynthetic light-use efficiency using the photochemical reflectance index: variations among species. *Functional Plant Biology* 31, 255–265.

Guo JM, Trotter CM. 2006. Estimating photosynthetic light-use efficiency using the photochemical reflectance index: the effects of short-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> and low temperature. *International Journal of Remote Sensing* 27, 4677–4684.

## H

Hall FG, Hilker T, Coops NC, Lyapustin A, Huemmrich KF, Middleton E, Margolis H, Drolet G, Black TA. 2008. Multi-angle remote sensing of forest light use efficiency by observing PRI variation with canopy shadow fraction. *Remote Sensing of Environment* 112, 3201–3211.

Hanson P, Amthor J. 2004. Oak forest carbon and water simulations: model intercomparisons and evaluations against independent data. *Ecological* 74, 443–489

Harley, P.C., Baldocchi, D.D., 1995. Scaling carbon dioxide and water vapour exchange from leaf to canopy in a deciduous forest: I. Leaf model parametrization. *Plant, Cell and Environment* 18, 1146 – 1156.

Harris A., Gamon J, Pastorello GZ, Wong C. 2014. Retrieval of the photochemical reflectance index for assessing xanthophyll cycle activity: a comparison of near-surface optical sensors. *Biogeosciences Discussions* 11, 11903–11942.

Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Bohm, V., & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6663–6668.

Hilker T., Coops N.C., Wulder M.A., Black T.A., Guy R.D. 2008. The use of remote sensing in light use efficiency based models of gross primary production: A review of current

- status and future requirements. *Science of the Total Environment*, 404, 411–423. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.11.007
- Hilker T, Wulder M a., Coops NC, Linke J, McDermid G, Masek JG, Gao F, White JC. 2009. A new data fusion model for high spatial- and temporal-resolution mapping of forest disturbance based on Landsat and MODIS. *Remote Sensing of Environment* 113, 1613–1627. DOI : 10.1016/j.rse.2009.03.007
- Hilker T, Gitelson A, Coops NC, Hall FG, Black TA. 2011. Tracking plant physiological properties from multi-angular tower-based remote sensing. *Oecologia* 165, 865–876.
- Hmimina G., Dufrêne E., Soudani K. 2013. Relationship between photochemical reflectance index and leaf ecophysiological and biochemical parameters under two different water statuses: Towards a rapid and efficient correction method using real-time measurements. *Plant, Cell and Environment* 37, 473–487. DOI: 10.1111/pce.12171
- Hmimina G., Merlier E., Dufrêne E., Soudani K., 2015. Deconvolution of pigment and physiologically-related PRI variability at the canopy scale over an entire growing season., *Plant. Cell Environ.* doi:10.1111/pce.12509.
- Hirose, T. & Bazzaz, F.A., 1998. Trade-off Between Light- and Nitrogen-use Efficiency in Canopy Photosynthesis. *Annals of Botany*, 82 (2 ), pp.195–202. Available at: <http://aob.oxfordjournals.org/content/82/2/195.abstract>.
- Horton P, Ruban A. 2005. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56, 365–373. DOI: 10.1093/jxb/eri023
- Huete A., Didan K., Miura T., Rodriguez E.P., Gao X., Ferreira L.G. 2002. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote Sensing of Environment* 83.195-213. DOI: 10.1016/S0034-4257(02)00096-2

# I

- Ibaraki Y, Matsumura K, Dutta Gupta S. 2010. Low-cost photochemical reflectance index measurements of micropropagated plantlets using image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 71, 170–175.
- Inoue Y., Peñuelas J. 2006. Relationship between light use efficiency and photochemical reflectance index in soybean leaves as affected by soil water content. *International Journal of Remote Sensing*, 27, 5109–5114. DOI: 10.1080/01431160500373039.
- Inoue, Y., Peñuelas, J., Miyata, A., & Mano, M. 2008. Normalized difference spectral indices for estimating photosynthetic efficiency and capacity at a canopy scale derived from hyperspectral and CO<sub>2</sub> flux measurements in rice. *Remote Sensing of Environment*, 112, 156–172.
- Inamullah, Isoda A. 2005. Adaptive Responses of Soybean and Cotton to Water Stress II. Changes in CO<sub>2</sub>Assimilation Rate, Chlorophyll Fluorescence and Photochemical Reflectance Index in Relation to Leaf Temperature. *Plant Production Science* 8, 131–138.
- IPCC First Assessment Report : Climate Change 2001: The Scientific Basis.
- IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007. Working Group I: The Physical Science Basis.
- Isoda A. 2005. Adaptive responses of soybean and cotton to water stress II . Changes in CO<sub>2</sub> assimilation rate. Chlorophyll fluorescence and photochemical reflectance index in relation to leaf temperature. *Plant Production Science*, 8, 131–138. DOI: 10.1626/pps.8.131



## J

- Jacquemoud S., Féret J.B., Ustin S.L. 2009. Compréhension et modélisation de la couleur des feuilles. École thématique interdisciplinaire du CNRS. 23-27 mars 2009 – Ecole de printemps (Roussillon en Provence).
- Jahns P. & Holzwarth A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817(1):182–193. doi:10.1016/j.bbabi.2011.04.012
- Jung M., Reichstein M., Bondeau A. 2009. Towards global empirical upscaling of FLUXNET eddy covariance observations: validation of a model tree ensemble approach using a biosphere model. *Biogeosciences* 6, 2001–2013

## K

- Kärenlampi L., Skärby L. 1996. Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts. UN-ECE Workshop Report, Department of Ecology and Environmental Science, University of Kuopio, ISBN 951-780-653-1.
- Khachik F., Beecher G. R., Whittaker N. F. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34, 603-616.
- Kováč D., Malenovský Z., Urban O., Špunda V., Kalina J., Ač A., Kaplan V., Hanuš J. .2013. Response of green reflectance continuum removal index to the xanthophyll de-epoxidation cycle in Norway spruce needles. *Journal of experimental botany*, ert069. doi: 10.1093/jxb/ert069

Krause, G. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42 : 313-349.

Krinner G, Viovy N, de Noblet-Ducoudré N, Ogée J, Polcher J, Friedlingstein P, Ciais P, Sitch S, Prentice IC. 2005. A dynamic global vegetation model for studies of the coupled atmosphere-biosphere system. *Global Biogeochemical Cycles* 19(1)

## L

La Porta N, Capretti P, Thomsen IM, Kasanen R, Hietala AM, Von Weissenberg K. 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30, 177–195. DOI: 10.1080/07060661.2008.10540534

Lebourgeois F, Pierrat J-C, Perez V, Piedallu C, Cecchini S, Ulrich E. 2010. Simulating phenological shifts in French temperate forests under two climatic change scenarios and four driving global circulation models. *International journal of biometeorology* 54, 563–81.

Le Quere C, Raupach MR, Canadell JG, Marland et al. G. 2009. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geosci* 2, 831–836.

Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. New York, NY, USA: Academic Press.

Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Klouvatou A., Vekkos K.A., Manetas Y., Karabourniotis G. 2006. The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany*, 98, 257–65. DOI: 10.1093/aob/mcl097

Louis, J. et al., 2005. Remote sensing of sunlight-induced chlorophyll fluorescence and reflectance of Scots pine in the boreal forest during spring recovery. *Remote Sensing of Environment*, 96, 37–48. DOI: 10.1016/j.rse.2005.01.013

## M

Lara MV, Andreo CS. 2011. C4 Plants Adaptation to High Levels of CO<sub>2</sub> and to Drought Environments. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*.

Menzel A, Fabian P. 1999. Growing season extended in Europe. *Nature*.

Merlier E., Hmimina G., Dufrêne E., Soudani K. 2015. Explaining the variability of the photochemical reflectance index (PRI) at the canopy-scale : Disentangling the effects of phenological and physiological changes; *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*

Meroni M, Picchi V, Rossini M, Cogliati S, Panigada C, Nali C, Lorenzini G, Colombo R. 2008. Leaf level early assessment of ozone injuries by passive fluorescence and photochemical reflectance index. *International Journal of Remote Sensing* 29, 5409–5422

Meroni M, Rossini M, Guanter L, Alonso L, Rascher U, Colombo R, Moreno J. 2009. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote Sensing of Environment* 113, 2037–2051.

Meyer S., Cerovic Z.G., Goulas Y., Montpied P., Demotes-Mainard S., Bidet L.P. R., Moya I., Dreyer E. 2006. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon–nitrogen balance within leaves?. *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1338-1348.

- Mills G., Wagg S., Harmens H. 2013. Ozone pollution: impacts on ecosystem services and biodiversity (NERC/Centre for Ecology & Hydrology)
- Moldau H., 1998. Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 617-622.
- Monteith JL, Moss CJ. 1977. Climate and the Efficiency of Crop Production in Britain [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 281 , 277–294.
- Moran J.A., Mitchell A.K., Goodmanson G., Stockburger K.A.. 2000. Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods. *Tree Physiology*, 20, 1113–1120. DOI: 10.1093/treephys/20.16.1113
- Moreno, A. et al., 2012. Assessment of MODIS imagery to track light-use efficiency in a water-limited Mediterranean pine forest. *Remote Sensing of Environment*, 123(0), pp.359–367.
- Moya, I., & Cerovic, Z.G. (2004) Remote Sensing of Chlorophyll Fluorescence: Instrumentation and Analysis. *Chlorophyll Fluorescence: A signature of Photosynthesis*. G. Papageorgiou and Govindjee ed. Springer. pp. 429-445.

## N

- Nakaji T., Oguma H., Fujinuma Y. 2006. Seasonal changes in the relationship between photochemical reflectance index and photosynthetic light use efficiency of Japanese larch needles. *International Journal of Remote Sensing*, 27, 493–509. DOI: 10.1080/01431160500329528.

- Nakaji, T. et al., 2008. Utility of spectral vegetation indices for estimation of light conversion efficiency in coniferous forests in Japan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148(5), pp.776–787.
- Nakaji T, Kosugi Y, Takanashi S, Niiyama K, Noguchi S, Tani M, Oguma H, Nik AR, Kassim AR. 2014. Estimation of light-use efficiency through a combinational use of the photochemical reflectance index and vapor pressure deficit in an evergreen tropical rainforest at Pasoh, Peninsular Malaysia. *Remote Sensing of Environment* 150, 82–92.
- Naumann JC, Young DR, Anderson JE. 2008. Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance, and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub *Myrica cerifera*. *Environmental and Experimental Botany* 63, 402–409. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.12.008
- Nichol CJ, Lloyd J, Shibistova O, Arneth A, Roser C, Knohl A, Matsubara S, Grace J. 2002. Remote sensing of photosynthetic-light-use efficiency of a Siberian boreal forest. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 54: 677–687.

## O

- Ogaya, R. & Peñuelas, J., 2003. Comparative field study of *Quercus ilex* and *Phillyrealatifolia*: photosynthetic response to experimental drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 50(2), pp.137–148.
- Ort DR. 2001. When there is too much light. *Plant Physiology* 125, 29–32.
- Ottander C, Campbell D, Öquist G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* 197: 176–183.

# P

- Peguero-Pina JJ, Morales F, Flexas J, Gil-Pelegrín E, Moya I. 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* 156, 1–11.
- Pell E, Schlagnhauser, C.D., Artega R.N. 1997. Ozone induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, 100(2)n 264-273.
- Peñuelas J., Filella I., & Gamon J. A. 1995. Assessment of photosynthetic radiation use efficiency with spectral reflectance. *The New Phytologist*, 131, 291–296. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03064.x
- Peñuelas J, Llusia J, Piñol J, Filella I. 1997. Photochemical reflectance index and leaf photosynthetic radiation-use-efficiency assessment in Mediterranean trees. *International journal of remote sensing*. 18, 2863–2868.
- Pfündel E, Bilger W. 1994. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research* 42, 89-109. DOI : 10.1007/BF02187121
- Pan Y, Birdsey RA, Fang J, Houghton R, Kauppi PE, Kurz WA, Phillips OL, Shvidenko A, Lewis SL, Canadell JG, Ciais P, Jackson RB, Pacala SW, McGuire AD, Piao S, Rautiainen A, Sitch S, Hayes D. 2011. A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*. 19;333(6045):988-93. doi: 10.1126/science.1201609
- Pontauiller, J. -Y., Graham, J. H., & Bert, G. D. (2003). Estimation of leaf area index using ground-based remote sensed NDVI measurements: Validation and comparison with two indirect techniques. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 26,381–387.
- Porcar-Castell A., Garcia-Plazaola J.I., Nichol C.J., Kolari P., Olascoaga B., Kuusinen N., Fernández-Marín B., Pulkkinen M., Juurola E., Nikinmaa E. 2012. Physiology of the

seasonal relationship between the photochemical reflectance index and photosynthetic light use efficiency. *Oecologia*, 170, 313–23. DOI: 10.1007/s00442-012-2317-9

Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 975, 384–394. DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0

Powles SB. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 35: 15–44.

## R

Rahimzadeh-Bajgiran P., Munehiro M., Omasa K. 2012. Relationships between the photochemical reflectance index (PRI) and chlorophyll fluorescence parameters and plant pigment indices at different leaf growth stages. *Photosynthesis Research*, 113, 261–271. DOI: 10.1007/s11120-012-9747-4

Ripullone F, Rivelli a. R, Baraldi R, Guarini R, Guerrieri R, Magnani F, Peñuelas J, Raddi S, Borghetti M. 2011. Effectiveness of the photochemical reflectance index to track photosynthetic activity over a range of forest tree species and plant water statuses. *Functional Plant Biology* 38, 177–186.

Rosati, A. &Dejong, T.M., 2003. Estimating Photosynthetic Radiation Use Efficiency Using Incident Light and Photosynthesis of Individual Leaves. *Annals of Botany*, 91 (7 ), pp.869–877.

- Rouse J.W. & Haas R.H. 1973. Monitoring vegetation systems in the great plain with ERTS. Third ERTS Symposium, Vol. 1. (pp. 309–317) Washington, DC: NASA. 1974NASSP.351.309R
- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP. 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica Et Biophysica Acta- Bioenergetics* 1817: 167–181
- Running SW, Thornton PE, Nemani R, Glassy JM. 2000. Global terrestrial gross and net primary productivity from the Earth Observing System. *Methods in ecosystem science*, 44–57

## S

- Sage R.F & Monson R.K. 1999, *C4 plant biology*, Academic Press, California, 597p, ISBN : 0-12-614440-0
- Sarlikioti V., Driever S.M., Marcelis L.F.M. 2010. Photochemical reflectance index as a mean of monitoring early water stress. *Annals of Applied Biology*, 157, 81–89. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2010.00411.x
- Sheffield J, Wood E. 2008. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics* 31, 79–105.
- Shrestha S, Brueck H, Asch F. 2012. Chlorophyll index, photochemical reflectance index and chlorophyll fluorescence measurements of rice leaves supplied with different N levels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 113, 7–13.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. 1975. Properties of NADPH and oxygen dependent epoxidation in isolated chloroplast, *Arch. Biochem. Biophys.* 171 70-77.



- Siefermann-Harms D., 1984. Evidence for a heterogenous organization of violaxanthin in thylakoïd membranes. *Photochemistry and Photobiology*, 40(4), 507–512. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1984.tb04625.x
- Siefermann-Harms D. 1988. High performance liquid chromatography of chloroplast pigments. One step separation of carotene and xanthophyll isomers, chlorophylls and pheophytins. *J. Chromatog* 448:411-416
- Sims D.A., Gamon J.A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81, 337–354. DOI: 10.1016/S0034-4257(02)00010-X
- Soudani K., François C., le Maire G., Le Dantec V., Dufrêne E. 2006. Comparative analysis of IKONOS, SPOT, and ETM+ data for leaf area index estimation in temperate coniferous and deciduous forest stands. *Remote Sensing of Environment* 102, 161–175.
- Soudani, K., Hmimina, G., Delpierre, N., Pontailier, J. -Y., Aubinet, M., Bonal, D., et al. (2012). Ground-based network of NDVI measurements for tracking temporal dynamics of canopy structure and vegetation phenology in different biomes. *Remote Sensing of Environment*, 123, 234–245.
- Soudani K., Hmimina G., Dufrêne E., Berveiller D., Delpierre N., Ourcival J.M., Rambal S., Joffre R. 2014. Relationships between photochemical reflectance index and light-use efficiency in deciduous and evergreen broadleaf forests. *Remote Sensing of Environment* 144, 73–84.
- Stylinski, C. D., Gamon, J. A., & Oechel, W. C. 2002. Seasonal patterns of reflectance indices, carotenoid pigments and photosynthesis of evergreen chaparral species. *Oecologia*, 131, 366–374.
- Suárez L., Zarco-Tejada P.J., Sepulcre-Cantó G., Pérez-Priego O., Miller J.R., Jiménez-Muñoz J.C., Sobrino J. 2008. Assessing canopy PRI for water stress detection with

diurnal airborne imagery. *Remote Sensing of Environment*, 112, 560–575. DOI: 10.1016/j.rse.2007.05.009

Strachan, I. B., Pattey, E., & Boisvert, J. B. (2002). Impact of nitrogen and environmental conditions on corn as detected by hyperspectral reflectance. *Remote Sensing of Environment*, 80, 213–224.

Stylinski C.D, Gamon J.A, Oechel, W.C. 2002. Seasonal patterns of reflectance indices, carotenoid pigments and photosynthesis of evergreen chaparral species. *Oecologia*, 131, 366–374. DOI: 10.1007/s00442-002-0905-9

Szabó I, Bergantino E, Giacometti GM. 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO reports* 6, 629–634.

Szilágyi A., Sommarin, M., Åkerlund, H.E. 2007. Membrane curvature stress controls the maximal conversion of violaxanthin to zeaxanthin in the violaxanthin cycle-influence of  $\alpha$ -tocopherol, cetylethers, linolenic acid, and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768, 2310–2318. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.06.001

## T

Thayer S.S. & Bjorkman O. 1990. Leaf Xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC, *Photosynthesis Research* 23: 331-343,

Takizawa K., Cruz J.A., Kanazawa A, Kramer D.M. 2007. The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf. *Biochimica et biophysica acta*, 1767, 10, 1233-1244. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2007.07.006

- Telfer A. 2002. What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 357(1426):1431– 1439. doi:10.1098/rstb.2002.1139, discussion 1439–1440, 1469– 1470
- Thayer S.S., Björkman, O. 1990. Leaf Xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC \*. *Photosynthesis Research*, 1035, 331–343. DOI: 10.1007/BF00034864
- Thenot F., Méthy M., Winkel T. 2002. The Photochemical Reflectance Index (PRI) as a water-stress index. *International Journal of Remote Sensing* 23, 5135–5139.
- Thornley, J., 1998. Dynamic model of leaf photosynthesis with acclimation to light and nitrogen. *Annals of Botany*, (August 1997), pp.421–430.
- Trotter G.M., Whitehead D., Pinkney E.J. 2002. The photochemical reflectance index as a measure of photosynthetic light use efficiency for plants with varying foliar nitrogen contents. 23, 1207–1212.
- Turner, D.P. et al., 2003. A cross-biome comparison of daily light use efficiency for gross primary production. *Global Change Biology*, 9(3), pp.383–395.
- Turner, D.P. et al., 2006. Evaluation of MODIS NPP and GPP products across multiple biomes. *Remote Sensing of Environment*, 102(3–4), pp.282–292.

## U

- Urban O, Janouš D, Acosta M, Czerný R, Marková I, Navrátil M, Pavelka M, Pokorný R, Šprtová M, Zhang R, et al. 2007. Ecophysiological controls over the net ecosystem exchange of mountain spruce stand. Comparison of the response in direct vs. diffuse solar radiation. *Global Change Biology* 13, 157–168.

## V

- Verdier B., Jouanneau I., Simonnet B., Rabin C., Van Dooren T. J., Delpierre N., Clobert J., Abbadie L., Ferrière R., Le Galliard, J. F. 2014. Climate and Atmosphere Simulator for Experiments on Ecological Systems in Changing Environments. *Environmental science & technology*, 48(15), 8744-8753.
- Verhoeven A. 2014. Sustained energy dissipation in winter evergreens. *NewPhytologist* 201: 57–65.
- Verhoeven AS, Adams WW, Demmig-Adams B. 1999. The xanthophyll cycle and acclimation of *Pinus ponderosa* and *Malva neglecta* to winter stress. *Oecologia* 118: 277–287.
- Verstraete M, Pinty B, Myneni R. 1996. Potential and limitations of information extraction on the terrestrial biosphere from satellite remote sensing. *Remote Sensing of Environment* 4257
- Vogg G, Heim R, Hansen J, Schäfer C, Beck E. 1998. Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. I.

## W

- Yang X., Tang J., Mustard J.F., Lee J.-E., Rossini M., Joiner J., William Munger J., Kornfeld A., Richardson A.D. 2015. Solar-induced chlorophyll fluorescence correlates with canopy photosynthesis on diurnal and seasonal scales in a temperate deciduous forest, *Geophysical Research Letters*, doi: 10.1002/2015GL063201.

- Weng J-H, Chen Y, Liao T. 2006. Relationships between chlorophyll fluorescence parameters and photochemical reflectance index of tree species adapted to different temperature regimes. *Functional Plant Biology* 33, 241–246.
- Weng J-H, Liao T-S, Hwang M-Y, Chung C-C, Lin C-P, Chu C-H. 2006. Seasonal variation in photosystem II efficiency and photochemical reflectance index of evergreen trees and perennial grasses growing at low and high elevations in subtropical Taiwan. *Tree physiology* 26, 1097–1104.
- Weng JH, Lai KM, Liao TS, Hwang MY, Chen YN. 2009. Relationships of photosynthetic capacity to PSII efficiency and to photochemical reflectance index of *Pinus taiwanensis* through different seasons at high and low elevations of sub-tropical Taiwan. *Trees - Structure and Function* 23, 347–356.
- White M a., Thornton PE, Running SW, Nemani RR. 2000. Parameterization and Sensitivity Analysis of the BIOME–BGC Terrestrial Ecosystem Model: Net Primary Production Controls. *Earth Interactions* 4, 1–85
- Winkel T, Méthy M, Thénot F. 2002. Radiation Use Efficiency, Chlorophyll Fluorescence, and Reflectance Indices Associated with Ontogenic Changes in Water-Limited *Chenopodium quinoa* Leaves. *Photosynthetica* 40, 227–232.
- Wong, C. Y. S. and Gamon, J. A. 2015. Three causes of variation in the photochemical reflectance index (PRI) in evergreen conifers. *New Phytol*, 206: 187–195. doi:10.1111/nph.13159
- Wu C, Niu Z, Tang Q, Huang W. 2010. Revised photochemical reflectance index (PRI) for predicting light use efficiency of wheat in a growth cycle: validation and comparison. *International Journal of Remote Sensing* 31, 2911–2924.
- Wu, C. et al., 2010. Revised photochemical reflectance index (PRI) for predicting light use efficiency of wheat in a growth cycle: validation and comparison. *International Journal of Remote Sensing*, 31(11), pp.2911–2924.

Wu C., Huang W., Yang Q., Xie Q. 2015. Improved estimation of light use efficiency by removal of canopy structural effect from the photochemical reflectance index (PRI), *Agric. Ecosyst. Environ.* 199, 333–338. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.10.017>.

## X

Xiao, Y., Zhao, W., Zhou, D., & Gong, H. (2014). Sensitivity Analysis of Vegetation Reflectance to Biochemical and Biophysical Variables at Leaf, Canopy, and Regional Scales. *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on*, 52(7), 4014-4024.

Xu, L. & Baldocchi, D.D., 2003. Seasonal trends in photosynthetic parameters and stomatal conductance of blue oak (*Quercus douglasii*) under prolonged summer drought and high temperature. *Tree Physiology*, 23 (13 ), pp.865–877.

## Y

Yamamoto H.Y. 1979. Biochemistry of the violaxanthin in the higher plants, *Pure Appl. Chem.* 57 639-648.

Yamamoto H.Y. 2006. Functional roles of the major chloroplast lipids in the violaxanthin cycle. *Planta*, 224, 719–724. DOI: 10.1007/s00425-006-0257-5

Yamauchi, N.; Watada, A. E. 1993. Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled or ethylene containing atmosphere. *J. Food Sci.*, 58, 616-618.

# Z

- Zaks J, Amarnath K, Kramer DM, Niyogi KK, Fleming GR. 2012. A kinetic model of rapidly reversible nonphotochemical quenching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 15757–62.
- Zhang X, Friedl MA, Schaaf CB, Strahler AH, Hodges JCF, Gao F, Reed BC, Huete A. 2003. Monitoring vegetation phenology using MODIS. *Remote Sensing of Environment* 84, 471–475.
- Zhou, Q. F., & Wang, J. H. 2003. Leaf and spike reflectance spectra of rice with contrasting nitrogen supplemental levels. *International Journal of Remote Sensing*, 24, 1587–1593.
- Zinnert J, Nelson J, Hoffman A. 2012. Effects of salinity on physiological responses and the photochemical reflectance index in two co-occurring coastal shrubs. *Plant and Soil* 354, 45–55.

**Titre :** Télédétection optique des réponses des forêts aux stress abiotiques

**Mots clés :** télédétection, photochemical reflectance index, écophysiologie, contrainte abiotique, photosynthèse

**Résumé :**

Anticiper les impacts des changements climatiques sur les écosystèmes terrestres, notamment sur le cycle du carbone, nécessite la compréhension et la quantification du fonctionnement photosynthétique des végétaux et leurs réponses aux contraintes abiotiques. Suivre l'évolution des propriétés spectrales des couverts végétaux par la télédétection permet d'avoir accès à leur fonctionnement à des échelles spatiales et temporelles variées. Plusieurs indicateurs optiques ont été développés afin d'accéder à la structure, la biochimie et le fonctionnement écophysiologique des végétaux. Le PRI (photochemical reflectance index), déterminé à partir de la réflectance mesurée dans des bandes étroites à 531 nm et 570 nm, est un proxy de l'efficacité de la plante à utiliser la lumière (LUE, light use efficiency) et plus particulièrement du cycle des xanthophylles, utilisé par la plante pour dissiper l'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. Cependant son usage à l'échelle du couvert végétal, ou à plus larges échelles temporelles et spatiales, entraîne l'implication de nombreuses sources de variabilités qui masquent la sensibilité du PRI au fonctionnement photosynthétique, particulièrement les variations biochimiques et phénologiques. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les facteurs qui jouent sur la variabilité du PRI à l'échelle de la feuille et du couvert, afin de caractériser ses réponses aux variations abiotiques de l'environnement et de démêler la composante phénologique de la composante physiologique du PRI. Des études ont été menées en conditions contrôlées, semi-naturelles et naturelles, sur des jeunes arbres et en forêt adulte, soumis à différentes contraintes abiotiques. L'analyse des courbes de réponse du

PRI aux variations de lumière incidente utilisée pour la photosynthèse (PAR, photosynthetically active radiation) permet d'isoler 3 paramètres. Le  $PAR_{sat}$ , la valeur de PAR pour laquelle le PRI sature, le  $PRI_0$ , la valeur du PRI à une intensité lumineuse faible (mesurée) ou nulle (estimée) et le  $\Delta PRI$ , l'amplitude de variation entre le  $PRI_0$  et la valeur de PRI maximum. En période de végétation, la variabilité du  $PAR_{sat}$  est principalement contrôlée par la disponibilité en eau pour la plante. La variabilité du  $PAR_{sat}$  est aussi impactée par la concentration d'ozone atmosphérique. En période de débourrement et de sénescence, la variabilité du contenu en chlorophylle régit la valeur du  $PAR_{sat}$ . Ce paramètre explique la variabilité physiologique du PRI et varie en fonction du facteur limitant la photosynthèse. La variabilité du  $PRI_0$  a été expliquée par la variabilité du contenu biochimique des feuilles en réponse au cycle saisonnier de la chlorophylle et à sa variabilité en conditions de stress. A l'échelle de la canopée, la variabilité de la structure du couvert s'ajoute à la variabilité biochimique du  $PRI_0$ . Le  $PRI_0$ , en temps que composante phénologique de la variabilité du PRI, peut être utilisé pour corriger le PRI afin de lui soustraire la variabilité structurale et obtenir un  $PRI_c$  fortement corrélé à la LUE. A l'échelle de la canopée, il a été montré que le PRI est principalement représentatif de la strate supérieure du couvert. Le  $\Delta PRI$  n'a montré aucune variation intra et inter-journalière, suggérant que le PRI répond non pas au contenu en xanthophylle des plantes, mais à un ratio maintenu constant. Ces résultats mettent en évidence l'importance d'isoler les différentes sources de variabilité du PRI avant de l'utiliser comme proxy du fonctionnement photosynthétique des écosystèmes terrestres.



**Title :** Optical responses of forest canopies to abiotic stress

**Keywords :** remote sensing, photochemical reflectance index, ecophysiology, abiotic constraint, photosynthesis

**Abstract :**

Anticipating impacts of climate change on terrestrial ecosystems, particularly on the carbon cycle, requires the understanding and the quantification of the plant photosynthetic functioning and of their responses to abiotic factors. Tracking variations of spectral properties of plants using remote sensing allows the access of plant functioning at various spatial and temporal scales. Several optical indices have been developed to assess plant canopy structure, biochemistry and ecophysiological functioning. The PRI (photochemical reflectance index), determined from reflectances measured in narrow bands at 531 nm and 570 nm, may be used as a proxy of light use efficiency (LUE) at leaf and canopy scales, and more particularly of the xanthophyll cycle used by plants to dissipate the excess light energy as heat. However the use of PRI at the canopy scale and at large temporal and spatial scales faces several difficulties related to the involvement of different sources of variability that blur PRI sensitivity to photosynthetic functioning. These sources of PRI variability are particularly linked to spatial and temporal variations of biochemical and phenological canopy properties. The aim of these studies is to better understand the factors affecting PRI variability at leaf and canopy scales, to assess the strength of the relationships between PRI and vegetation responses to environmental abiotic constraints and disentangling the phenological component from the physiological component of PRI. Studies were conducted under controlled, semi-natural and natural conditions, on young trees and a mature deciduous forest subjected to various abiotic constraints. The analysis of PRI responses to the variations of

photosynthetically active radiation (PAR) allowed isolating three parameters. The  $PAR_{sat}$ , the PAR value at the PRI saturation; the  $PRI_0$ , the value of PRI at dim light (measured) or in darkness (estimated) and the  $\Delta PRI$ , the range of PRI variations between the  $PRI_0$  and the maximum value of PRI. During the leaf growing season,  $PAR_{sat}$  variability is mainly controlled by the availability of water content for the plant. The  $PAR_{sat}$  variability is also impacted by the atmospheric ozone concentration. During the phenological phases of budburst and the senescence, the variability of the leaf chlorophyll content governs  $PAR_{sat}$  values. This parameter describes the physiological variability of PRI and varies depending on the limiting factor for photosynthesis. The  $PRI_0$  variability has been explained by the dynamic of the biochemical content of the leaves linked to the seasonal variations of chlorophyll content and to abiotic stress conditions. At canopy scale, the structural variability is added to the biochemical variability of  $PRI_0$ . The  $PRI_0$ , as the phenological component of PRI variability, can be used to correct PRI, removing its structural variability to obtain a  $PRI_c$  strongly correlated to LUE. At canopy scale, it was shown that the PRI is mostly representative of the upper layer of the canopy. The  $\Delta PRI$  showed no variation within and between days, suggesting that the PRI does not respond to the plant xanthophyll content but rather to a ratio maintained constant. These results highlight the importance of isolating the different sources of PRI variability before its use as a proxy of the photosynthetic functioning of terrestrial ecosystems.

