



Stratégies d'acclimatation de deux plantes alpines, *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, à deux points clefs de leur développement

Anne-Claire Talhouët

► To cite this version:

Anne-Claire Talhouët. Stratégies d'acclimatation de deux plantes alpines, *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, à deux points clefs de leur développement. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2020. Français. [⟨NNT : 2020UPASS018⟩](#). [⟨tel-03155656⟩](#)

HAL Id: tel-03155656

<https://theses.hal.science/tel-03155656v1>

Submitted on 2 Mar 2021

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.



HAL Authorization

Stratégies d'acclimatation de deux plantes alpines, *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, à deux points clefs de leur développement.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 567, sciences du végétal : du gène à l'écosystème
(SDV)

Spécialité de doctorat: Biologie

Unité de recherche : ESE UMR 8079 Ecologie Systématique et Evolution

Référent : Faculté des Sciences

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 28 février 2020,
par**

Anne-Claire TALHOUËT

Composition du Jury

Claire DAMESIN

Professeur, Université Paris Saclay

Présidente

Christiane GALLET

Professeur, Université Savoie Mont-Blanc

Rapporteur & Examinatrice

Giovanni FINAZZI

Directeur de recherche, CNRS

Rapporteur & Examineur

Arnould SAVOURE

Professeur, UPMC

Examineur

Pierrick PRIAULT

Maitre de conférence, Université de Lorraine

Examineur

Peter STREB

Maitre de conférence, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Titre : Stratégies d'acclimatation de deux plantes alpines, *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, à deux points clefs de leur développement.

Mots clés : écophysiologie, acclimatation, photosynthèse, plantes alpines, stress.

Résumé : Les plantes alpines sont soumises à des conditions stressantes, avec des températures extrêmes et des rayonnements lumineux et UV intenses. La majorité de ces plantes se développent donc sur une période de végétation courte. Mais quelques exceptions existent : *Soldanella alpina* et *Geum montanum* gardent leurs feuilles pendant plusieurs périodes de végétation. Elles sont ainsi confrontées à des variations brutales de leur environnement, en particulier lors des changements de saison, ce qui est source de stress oxydant. Ainsi au printemps, la neige fond et la température foliaire passe rapidement de -10 à 40 ° C couplé à une augmentation de l'intensité lumineuse et lors de l'automne les feuilles, jusqu'alors recouvertes par la végétation alentour et donc acclimatées à l'ombre, doivent faire face à de fortes luminosités. Pour tolérer ces changements rapides, on peut supposer que *S. alpina* et *G. montanum* ont développés des stratégies d'acclimatation uniques que j'ai cherché à comprendre au cours de ma thèse.

A l'automne comme au printemps, le principal souci pour les feuilles de *S. alpina* et *G. montanum* vient du fait qu'elles sont acclimatées à des intensités lumineuses faibles.

Nous avons montrée que les feuilles s'accliment au changement d'intensité lumineuse par le biais de changements morphologiques et en améliorant leur photoprotection grâce à une augmentation de la concentration en flavonoïdes pour les 23 flavonoïdes majeurs retrouvé dans l'épiderme et le mésophylle des feuilles de *S. alpina*. Cependant il n'y a pas d'acclimatation de la photosynthèse aux changements d'intensités lumineuses à l'automne : les feuilles confrontées à des lumières fortes n'arrivent pas utiliser la totalité de cette énergie lumineuse. Cet excès d'énergie crée un déséquilibre entre le flux électronique total et le flux électronique utilisé pour les processus photochimique ce qui abouti en un stress oxydant exacerbé, au printemps, quand au stress lumineux s'ajoutent des températures extrêmes. Après avoir réussi à estimer les différents flux électroniques, on constate chez *S. alpina* et *G. montanum* l'existence d'un flux d'électrons en excès, non dissipé par la photosynthèse. La dissipation d'énergie sous forme de chaleur et une capacité forte de la valve malate et du système anti-oxydant permettent respectivement de limiter et consommer en partie les électrons en excès.

Title : Acclimation strategies of two alpine plants, *Soldanella alpina* and *Geum montanum*, at two key points of their development.

Keywords : ecophysiology, acclimation, photosynthesis, alpine plants, stress.

Abstract : Alpine plants are subject to stressful conditions, with extreme temperatures, intense light, and UV radiation. The majority of these plants therefore develop over a short growing period. But some exceptions exist: *Soldanella alpina* and *Geum montanum* keep their leaves during several vegetation periods. They are thus confronted with brutal variations of their environment, in particular during the changes of season, which is a source of oxidative stress. Thus in spring, the snow melts and the leaf temperature quickly goes from -10 to 40 ° C coupled with an increase in light intensity and in autumn the leaves, hitherto covered by the surrounding vegetation and therefore acclimated to shade, have to face strong lights. To tolerate these rapid changes, we can assume that *S. alpina* and *G. montanum* have developed unique acclimation strategies that I sought to understand during my thesis.

In autumn and spring, the main concern for the leaves of *S. alpina* and *G. montanum* comes from the fact that they are acclimated to low light intensities.

We have shown that the leaves acclimate to the change in light intensity through morphological changes and by improving their photoprotection thanks to an increase in the concentration of flavonoids for the 23 major flavonoids found in the epidermis and mesophyll of the leaves in *S. alpina*. However, there is no acclimation of photosynthesis to changes in light intensities in the fall: the leaves confronted with strong lights cannot manage to use all of the light energy. This excess energy creates an imbalance between the total electronic flux and the electronic flux used for photochemical processes which result in exacerbated oxidative stress, in the spring, when in addition to light stress there are extreme temperatures. After having succeeded in estimating the various electronic fluxes, we observe in *S. alpina* and *G. montanum* the existence of a flux of excess electrons, not dissipated by photosynthesis. The dissipation of energy in the form of heat and a strong capacity of the malate valve and the antioxidant system allow respectively to limit and partly consume the excess electrons.

Table des matières

Remerciements.....	1
Avant propos.....	4
Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	8
1. Le climat alpin	9
1.1. Mise en contexte générale.....	9
1.2. Températures	10
1.3. Période de végétation et cycle de vie de <i>Soldanella alpina</i> et <i>Geum montanum</i>	13
1.4. Ensoleillement et UV.....	14
1.5. Impact du réchauffement climatique.....	16
2. Gestion des stress abiotiques chez les plantes	17
2.1. Rappel sur la photosynthèse.....	17
2.2. Conséquences des stress abiotiques alpins.....	22
2.3. Adaptation morphologiques connues des plantes alpines.....	27
2.4. Adaptations et acclimatation physiologique des plantes aux stress alpins.....	29
3. Cadre de l'étude.....	38
Matériel & méthodes.....	41
1. Sites d'études	41
1.1. Laboratoire d'Orsay.....	41
1.2. Station alpine Joseph Fourier.....	41
2. Matériel végétal, conditions de culture et traitement.....	43
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> et <i>Thellungiella salsuginea</i>	43
2.2. <i>Geum montanum</i>	45
Figure 22: Photographie d'une plante de <i>Geum montanum</i> en fleur, Fondation Saxifrage, Willem van Kruijsbergen, freenatureimages.eu.....	46
2.3. <i>Soldanella alpina</i>	46
2.4. Conditions de culture et traitements de <i>Geum montanum</i> & <i>Soldanella alpina</i>	47
3. Récapitulatif des principales mesures effectuées et des limites rencontrées au cours de cette thèse.....	48
4. Mesure en laboratoire des paramètres photosynthétiques d'échanges gazeux et de fluorescence.....	51

5.	Calculs basés sur les mesures d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne.	
	53	
5.1.	Recalcul des paramètres de fluorescence.....	53
5.2.	Estimation du flux d'électron photorespiratoire et du flux alternatif d'électrons...	54
6.	Mesures in situ.....	63
6.1.	Mesure de photoinhibition.....	64
6.2.	Quantification non destructive des pigments	66
7.	Quantification chimique des activités enzymatiques et des pigments chlorophylliens.	69
7.1.	Quantification chimique des pigments.....	69
7.2.	Quantification chimique des activités enzymatiques.....	70
8.	Quantification et identification des flavonoïdes.....	74
8.1.	Extraction des flavonoïdes	74
8.2.	Caractérisation des flavonoïdes par spectrométrie de masse.....	75
8.3.	Recherche des flavonoïdes participant à la protection UV dans les épidermes et les mésophiles adaxiales et abaxiales des feuilles de <i>Soldanella alpina</i>	76
9.	Analyse anatomique	77
10.	Spectre de fluorescence chlorophyllienne à 77k.....	78
11.	Etude de la vitesse de ré oxydation du pool de quinone.....	79
12.	Traitement statistique des données.....	82
13.	Récapitulatif des mesures effectuées.....	83
	Résultats	85
	Chapitre 1:.....	87
	Take home message :	142
	Chapitre 2 :	144
	Abstract :	145
	Résumé :	145
	Take home message:	159
	Chapitre 3 :	160
	Méthode de détermination du flux d'électron excédentaire	160
	Validation du modèle avec <i>A.thaliana</i> et <i>T.salsuginea</i>	186
	Discussion.....	192

Vers une nouvelle méthode d'étude de la distribution des électrons photosynthétique vers les différents accepteurs.....	192
Conclusion.....	199
Chapitre n°4 :	202
Application du modèle pour estimer la distribution des électrons durant la vie des feuilles chez <i>Geum montanum</i> et <i>Soldanella alpina</i>	202
La diminution de la photosynthèse chez les feuilles sous la neige est-elle due à une limitation en amont du PSII de la conversion d'énergie lumineuse en flux électronique ?	211
Si la limitation du Jt chez les feuilles présentes sous la neige n'est pas seulement due à des processus ayant lieu en amont du PSII, est ce que ça pourrait être dû à des processus ayant lieu en aval du PSII?.....	217
Quels moyens de dissipation pour les électrons qui ne vont pas à la Rubisco ?.....	220
Discussion.....	226
Un flux excédentaire non nul chez les plantes alpines.	226
Pourquoi a-t-on un transport électronique plus faible chez les plantes sous la neige ?	231
Est-ce que le transport en excès est corrélé avec les moyens de dissipation des électrons autre que la photosynthèse et la photorespiration?.....	234
Conclusion.....	237
Conclusion générale.....	240
Bibliographie	245

Remerciements

Je me suis lancée en 2016 dans cette thèse en me disant que ça ne serait guère plus compliqué que deux années de classe préparatoire. Il se trouve que j'avais tort...et que dans les faits, ma thèse et ce mémoire n'auraient pas pu être finis sans le concours d'un certain nombre de personnes que je tiens ici à remercier.

A Peter Streb, mon encadrant, qui m'a proposé ce challenge de travailler sur ce projet et m'a encadré tout au long de ma thèse.

A mon laboratoire d'accueil, l'ESE et notamment les membres de l'équipe EV pour la gentillesse et la bonne humeur dont vous avez fait preuve. Merci à vous Zoran, Kamel, Gaëlle, Stéphane, Eric, Gwendal, Marine, Laure, Chantal et Claire, d'avoir été présents au cours de ses trois années de ma vie pendant lesquelles vous m'avez apporté votre soutien et votre aide, sur le plan professionnel, comme parfois sur le plan personnel. J'ai notamment une pensée particulière pour Claire qui a accepté d'être la présidente de mon jury de thèse.

A Caroline, qui de stagiaire est devenue amie. Merci pour les bons moments passés ensemble, ta bonne humeur et ton aide précieuse sur le terrain (tant morale que matérielle).

A Anja Krieger-Liskay pour tes excellents conseils en temps que membre de mon comité de suivis comme en temps que collègue. Merci aussi pour l'aide précieuse que tu m'as apporté pour mes manips, notamment de western-blots.

A Pierre Carol, ancien professeur qui a également eu la gentillesse d'accepter de m'accompagner tout au long de ma thèse en participant à mes comités.

A l'équipe du CEA de Saclay, et notamment Mélanie, pour m'avoir accueillie, aidée et soutenue pendant mes manips de western blot.

A Giovanni Finazzi qui m'a prêté de nombreux instruments de mesure et encadré sur certaines manips. Ton aide avec la caméra a été salvatrice. Merci pour ta gentillesse, ton hospitalité et tout le temps que tu as passé à m'aider. Merci aussi d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

A Christiane Gallet qui a acceptée d'être le second rapporteur de ma thèse et à Arnould Savouré et Pierrick Priault qui ont accepté de faire partis de mon jury.

A Jacqui, Martine, l'ED et le personnel administratif de l'ESE, pour avoir été à l'écoute des problèmes que je rencontrais et m'avoir aidé à trouver les solutions avec le sourire.

Au CNRS de Grenoble qui a mis à ma disposition les laboratoires de la Station Alpine Joseph Fourier.

Au personnel des Jardins Botanique du Lautaret, notamment Raphael et Pascal, pour leur accueil chaleureux et leur aide. Grace à vous on se sentait un peu comme à la maison au Lautaret.

A Aurélie et la Team Marmotte pour la bonne humeur et le soutien sur le terrain. On gardera de ses séjours au Lautaret des souvenirs mémorables de marshmallows grillés au feu sur le Col du Galibier, de réaménagement à la Stephane Plaza....

A mes enseignants Mme Mounier, Mr Rosé, Julien Gasparini et Emmanuel Baudouin. Vous avez su me transmettre votre passion pour la biologie. Merci d'avoir été de si bons professeurs, je n'aurais pas été aussi avide de connaissances et je ne me serais pas engagée à faire une thèse d'écophysiologie végétale si je n'avais pas eu la chance au cours de ma scolarité de suivre vos enseignements.

A mes parents qui m'ont donné les moyens financiers de faire ce parcours qu'est le mien et qui m'a amenée à faire cette thèse.

A ma tante, Céline, qui m'a convaincu que je n'étais pas bête au point de ne pas envisager cette voie.

Plus généralement à ma famille et notamment à mes frères et ma sœur, pour leur soutien inconditionnel et leur compréhension.

Aux amis fidèles qui sont resté à mes côtés et m'ont soutenu ses trois dernières années.

Et enfin à Tiphaine, ma compagne de galère. Merci d'avoir toujours été présente pour me remonter le moral ou pour m'aider à relativiser quand mes manip ne fonctionnaient pas,....Entre thésarde en galère on se comprend et qu'est ce que ça faisait du bien de trouver auprès de toi une oreille attentive, une amie compréhensive et une âme généreuse quand il s'agit d'aider.

Avant propos

Le travail expérimental dans le cadre de cette thèse a été réalisé sous la direction de Peter Streb dans les structures de recherches suivantes :

- Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, UMR 8079 Université Paris XI / CNRS, bât. 362, 91405 Orsay
- Station Alpine Joseph Fourier, UMS 3370 Université Joseph Fourier / CNRS, Col du Lautaret, 05480 Villar d'Arène

ADP : adénosine diphosphate

AOx : Alternative oxydase

APX : Ascorbate peroxydase chloroplastique

APXc : Ascorbate peroxydase cytoplasmique

ATP : adénosine triphosphate

C* : point de compensation de la photosynthèse

Chl : chlorophylle

Ci : Fraction molaire de CO₂ présent dans les espaces intercellulaires des feuilles.

Ca : Fraction molaire de CO₂ dans l'air ambiant

CO₂ : dioxyde de carbone

Cyt b6/f Complexe protéique contenant le Cytochrome b6 et le cytochrome f

EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid

ETR: Electron transfert rate, flux électronique au niveau du PSII.

ETRc : Electron transfert rate carboxylation, flux électronique allant à la carboxylation de la Rubisco

ETRexcès : Electron transfert rate excess, flux électronique excédentaire.

ETRo : Electron transfert rate oxygenation, flux électronique allant à l'oxygénation de la Rubisco.

Fm: fluorescence maximale de la chlorophylle mesurée après acclimatation à l'obscurité, donc lorsque tous les centres réactionnels sont fermés.

Fm' : fluorescence maximale de la chlorophylle mesurée en présence d'une exposition lumineuse.

F₀: fluorescence à l'état initial. Correspond à la fluorescence minimale de la chlorophylle mesurée après acclimatation à l'obscurité, donc lorsque tous les centres réactionnels de PSII sont ouverts.

F₀' : fluorescence minimale de la chlorophylle mesurée en présence d'une exposition lumineuse.

Ft : fluorescence de la chlorophylle à l'état stationnaire

Fv : fluorescence variable de la chlorophylle (F₀-Fm)

Fv' : fluorescence variable de la chlorophylle (F₀'-Fm') mesurée en présence d'une exposition lumineuse.

Fv/Fm : rapport de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale. Il est corrélé au rendement quantique de la photosynthèse et a une valeur d'environ 0.8 chez une plante saine.

Fv'/Fm' : rapport de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale mesurée en présence d'une exposition lumineuse.

Hepes : acide N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'[2-éthane] sulfonique

Jt : flux électronique total

LHC: complexe collecteur d'énergie lumineuse

LHCI ou II: complexe chlorophylle/protéine collecteur d'énergie lumineuse du photosystème I ou II

NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

NADPH-MDH : NADPH-Malate déshydrogénase

NAD-MDH : NAD-malate déshydrogénase

Ndh: complexe NAD(P)H déshydrogénase chloroplastique

NPQ : Quenching non photochimique correspondant à la dissipation de chaleur par le biais du cycle des anthocyanes.

P680: centre réactionnel du PSII

P700: centre réactionnel du PSI

PFD : Photon flux density ($\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$)

PC: plastocyanine 3-PGA acide 3-phosphoglycérique

PQ: plastoquinone

PQH₂: plastoquinol (Plastoquinone réduite)

PSI et PSII: photosystème I et Photosystème II

PTOX: oxydase terminale chloroplastique

PDS : Phytoène désaturase

Rc/o : Ratio de la vitesse des réactions de carboxylation/oxygénation de la Rubisco

R_L : respiration à la lumière

ROS : Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

Rubisco: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase

RuBP : ribulose 1,5 bisphosphate

Sapp : facteur de spécificité apparent de la Rubisco.

SDS: Dodécyl sulfate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

TCA : Trichloroacétate.

Tris : Tris [hydroxyméthyl] aminométhane ou trizma base

UV : Rayonnement ultra-violet

Vc : vitesse de carboxylation de la Rubisco

Vo : vitesse d'oxygénation de la Rubisco

ZDS : ξ -carotène désaturase

δ^* : gamma star correspondant à la concentration de CO_2 au point de compensation de la photosynthèse.

ϕCO_2 : rendement quantique de la photosynthèse.

ϕPSII : rendement quantique du PSII.

Introduction

1. Le climat alpin

1.1. Mise en contexte générale.

Les Alpes sont l'une des chaînes de montagne majeure d'Europe. Elles mesurent 1200km de long pour de 140 à 240km de large et forme une frontière naturelle qui s'étale sur 8 pays : la France, la Suisse, l'Italie, Monaco, le Liechtenstein, l'Autriche, l'Allemagne et la Slovénie. (Faverger and Robert, 1995)

On y retrouve un certain nombre de sommets de plus de 4000m d'altitude dont le Mont Blanc, point culminant de l'Europe.

On peut parler au niveau des grands massifs montagneux de climat alpin car, quelque soit la latitude ou la position géographique de ces grands massifs montagneux, l'évolution de la végétation et de certains paramètres météorologiques tels que les températures moyennes ou la pluviométrie sont d'avantage déterminés par l'altitude que la latitude.

On peut notamment distinguer 5 « étages » pour lesquels les végétations sont distinctes : (Ozenda, 1985; Faverger and Robert, 1995)

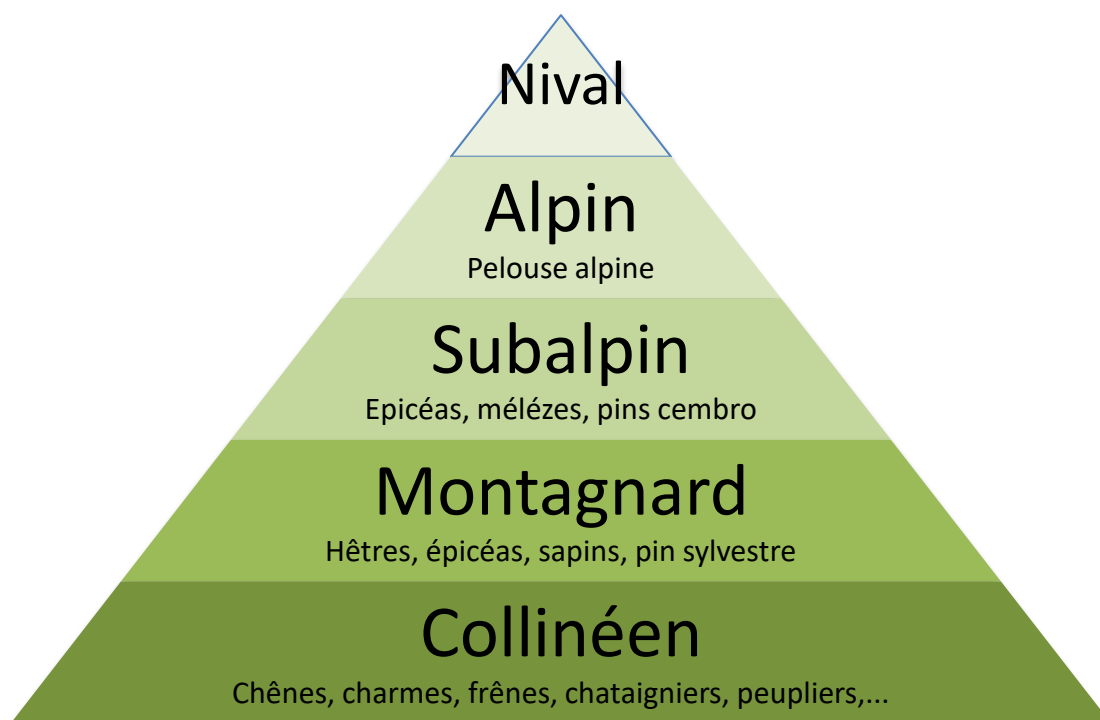


Figure 1: schéma des différents étages alpins et de leur végétation caractéristique

Le climat alpin n'est pas uniforme, que ce soit au niveau des Alpes ou au niveau des autres massifs montagneux ayant un climat qualifié d'alpin. (Faverger and Robert, 1995) En revanche, certains paramètres sont conservés :

- diminution de la température moyenne avec l'altitude
- contraste important entre températures diurnes et nocturnes
- diminution de la période de végétation avec l'altitude
- pluviométrie importante
- abondance de la neige et fréquence des épisodes de gel
- vents violents
- intensité lumineuse importante et forte portion d'UV

1.2. Températures

Dans les Alpes, on peut observer une baisse linéaire de la température moyenne en fonction de l'altitude de l'ordre de 0.5°C à 0.7°C par 100m d'élévation. (Faverger and Robert, 1995)

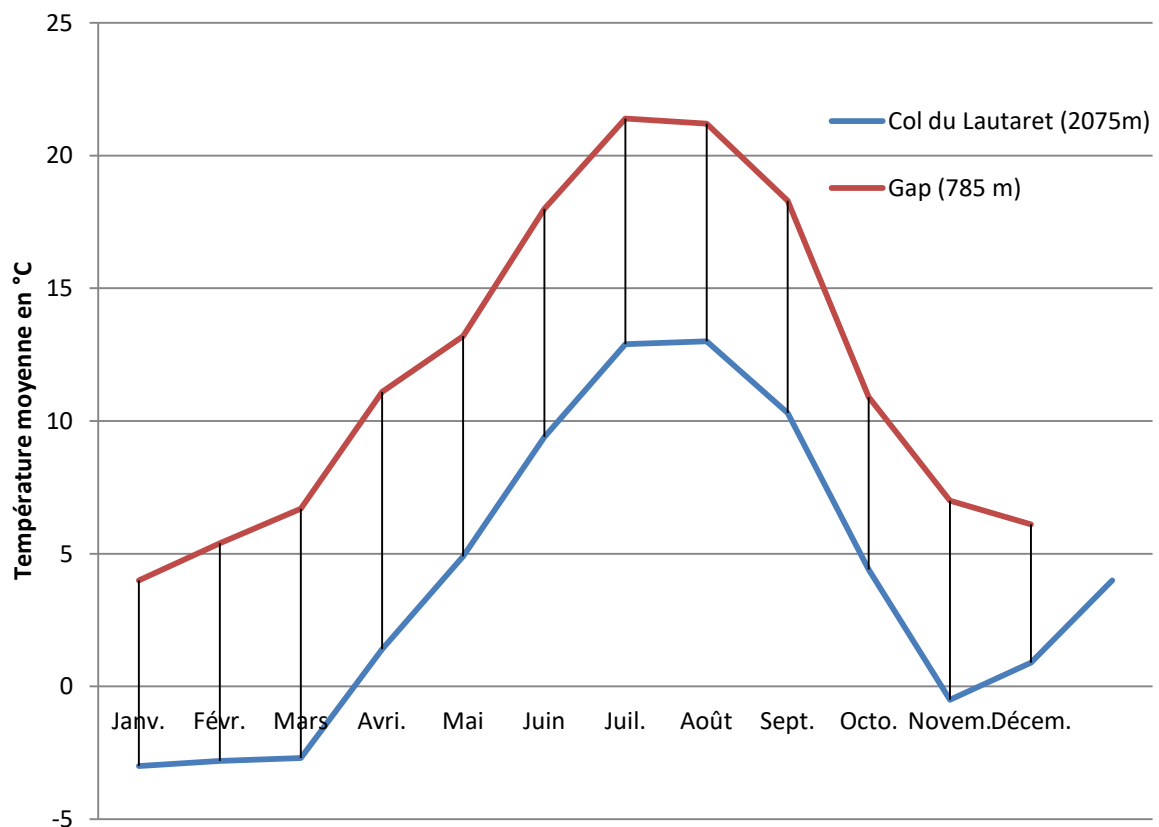


Figure 2: Températures moyennes annuelles au Col du Lautaret et à Gap pour l'année 2016 (d'après les données de ROMMA)

On observe également une forte disparité entre les températures diurnes et nocturnes, avec des températures très basse la nuit du fait de l'absence de lumière alors

qu'en journée on a un échauffement important des sols de part la forte intensité lumineuse incidente.

Sur le site d'étude du col du Galibier, à 2400m d'altitude, on peut mesurer en juillet/ août les températures suivantes :

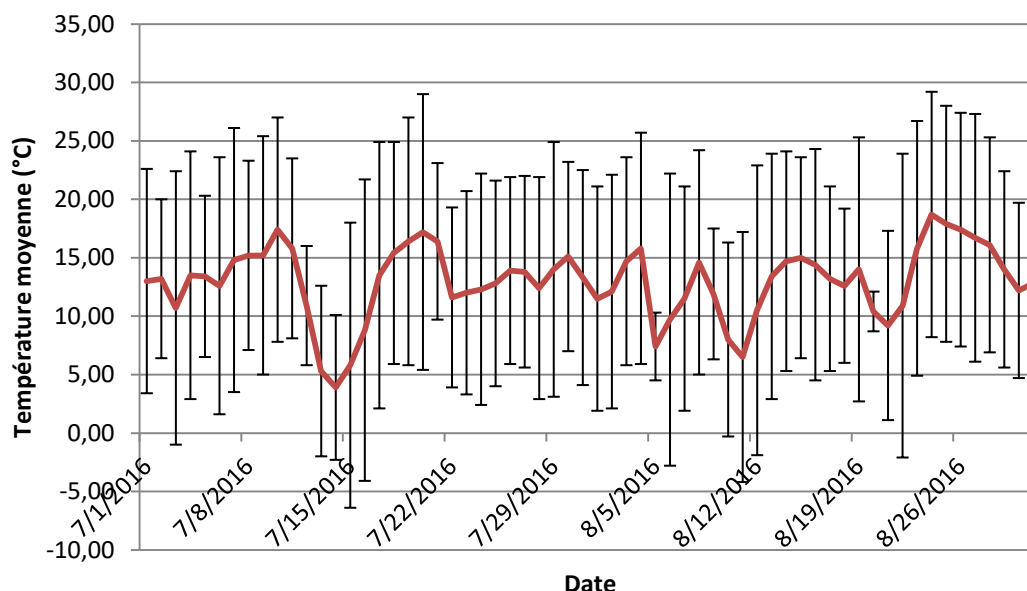


Figure 3: détail des températures moyennes et des amplitudes thermique au Col du Lautaret pendant les mois de Juillet et Aout 2016 (d'après les données de ROMMA)

En dehors des différences de températures jour/nuit on peut noter une forte variation des températures au moment de la fonte de neige. C'est l'acclimatation de *Geum montanum* et *Soldanella alpina* à cette variation importante de température qui a été en partie étudiée dans le cadre de cette thèse.

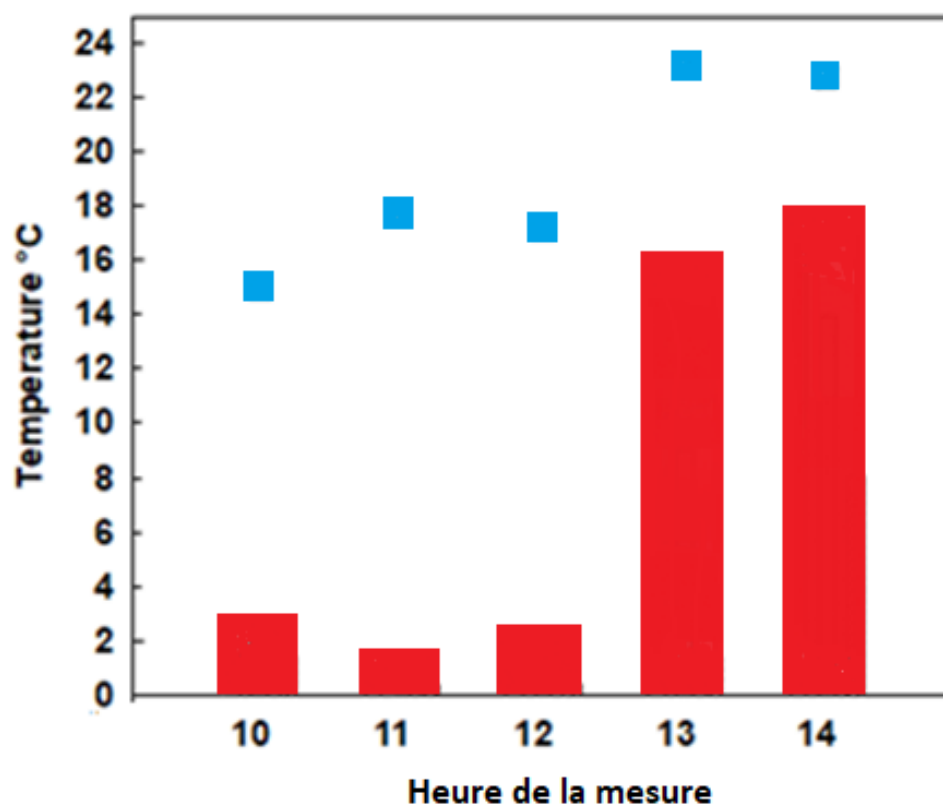


Figure 4 Température (en °C) durant la fonte des neiges au niveau d'une feuille de *Soldanella alpina* (en rouge) d'après (Streb and Cornic, 2012) En bleu est figuré la température de l'air au moment de la mesure, en rouge la température de la feuille.

Il est également possible d'observer un micro-climat avec des températures parfois importantes au niveau foliaire comme ça a pu être mesuré ici sur le terrain.

	Période de mesure	
Température foliaire maximale (°C)	mi-juin (période de fonte des neiges)	35 °C
Température foliaire minimale (°C)	mi-juin (période de fonte des neiges)	-4 °C
Température foliaire maximale (°C)	Juillet-aout (après fonte des neiges)	40 °C
Température foliaire minimale (°C)	Juillet-aout (après fonte des neiges)	-2°C

Figure 5: Tableau récapitulatif des extrêmes de températures constatés au niveau des feuilles de *Soldanella alpina* pendant la fonte des neiges et après.

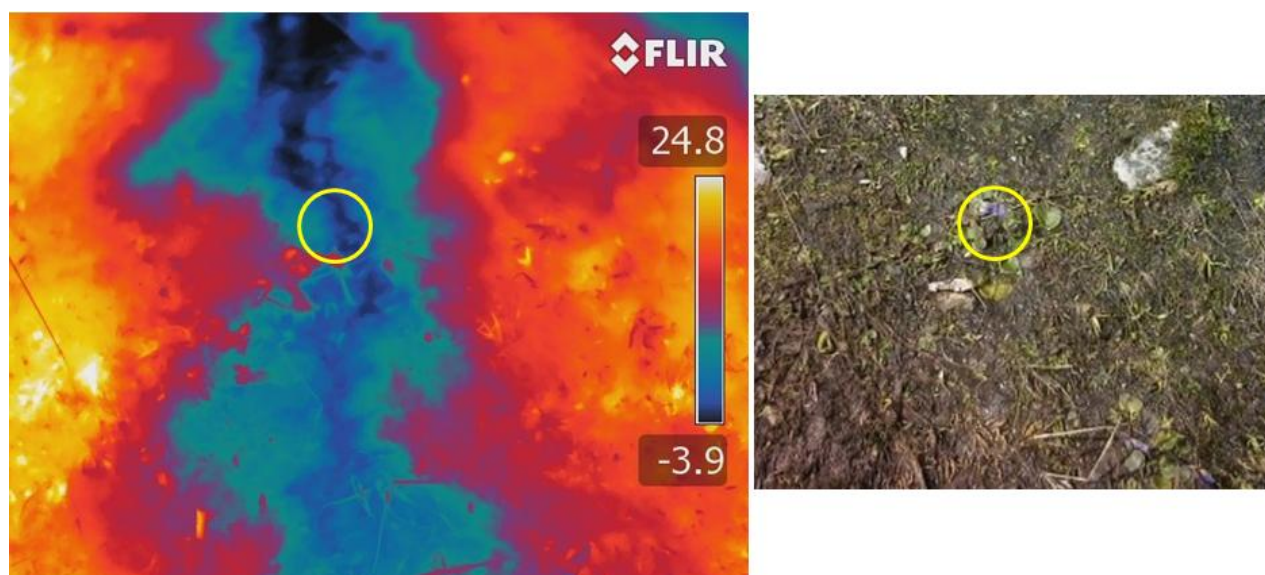


Figure 6: Mesure par caméra thermique de la température foliaire au niveau des feuilles de *Soldanella alpina* au court de la fonte des neiges. La plante est identifiée par un cercle jaune.

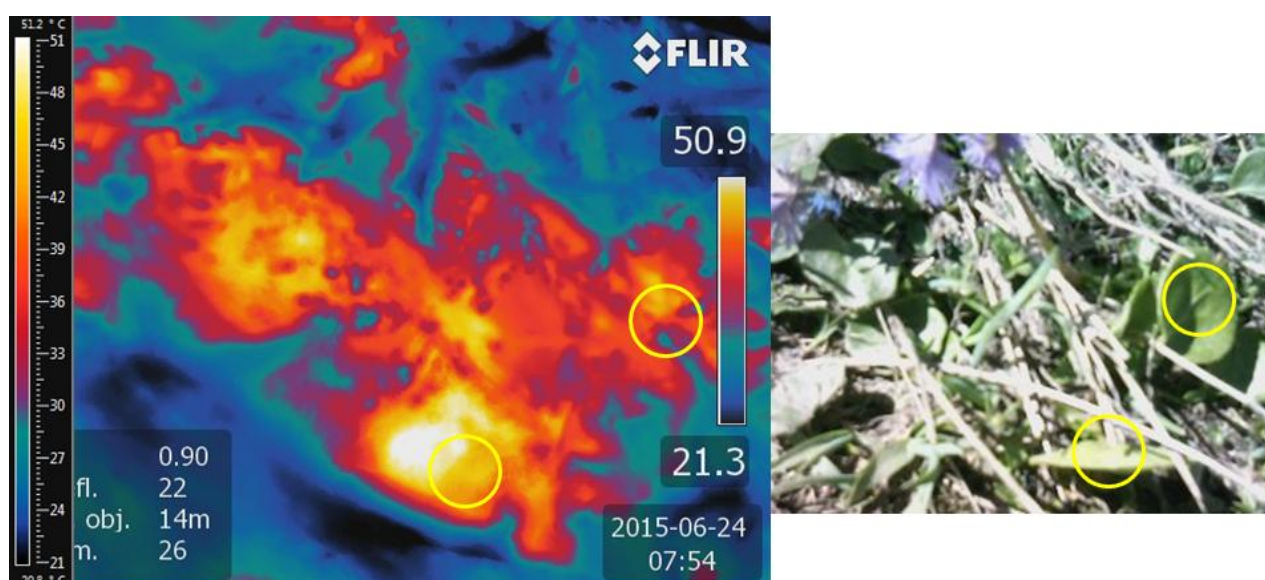


Figure 7 : Mesure par caméra thermique de la température foliaire au niveau des feuilles de *Soldanella alpina* après la fonte des neiges. Les feuilles sont identifiées par un cercle jaune.

1.3. Période de végétation et cycle de vie de *Soldanella alpina* et *Geum montanum*

Dans les Alpes, la période de végétation est relativement courte. En effet, celle-ci dépend de la température moyenne qui doit être d'environ 5°C pour permettre la croissance des végétaux. Ainsi, en milieu montagneux, la durée de la période de végétation dépend particulièrement de l'altitude. Elle commence peu de temps après la fonte des neiges qui a lieu en mai et dure environ 2 à 3 mois au niveau de l'étage alpin. (Pettorelli *et al.*, 2007)

Pour les plantes composant la prairie alpine, cette courte période de végétation signifie que le développement et la reproduction doit se faire rapidement.

Geum montanum et *Soldanella alpina* qui sont étudiés dans cette thèse sont deux plantes de prairies alpines qui gardent leurs feuilles vertes sous la neige pendant l'hiver. Au moment de la fonte des neiges les feuilles qui émergent, formées l'année précédente, sont prêtes à faire de la photosynthèse qui peut alors contribuer à fournir de l'énergie pour la formation de nouvelles feuilles. Cette stratégie permet à *G.montanum* et *S.alpina* de bénéficier, au début de la période de végétation, d'une intensité lumineuse importante sans être en compétition avec les autres plantes alpines. Cet avantage disparaît au fur et à mesure de la période de végétation alors que *G.montanum* et *S.alpina* sont recouvertes par la végétation alentour.

A la fin de la période de végétation, la majorité de la végétation constituant la prairie alpine sénesce ou est pâturée. Les plantes pérennes, telles que les *S.alpina* et *G.montanum*, restent et sont alors progressivement recouvertes par la neige.

1.4. Ensoleillement et UV.

Radiations ultraviolettes.

Les radiations ultraviolettes sont des ondes lumineuses hautement énergétique. En fonction de leurs impacts biologiques sur les organismes, il est possible de distinguer trois types d'UV : les UV-A dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 400nm et 315nm, les UV-B entre 315 et 280nm et enfin les UV-C entre 280nm et 200nm (Diffey, 2002).

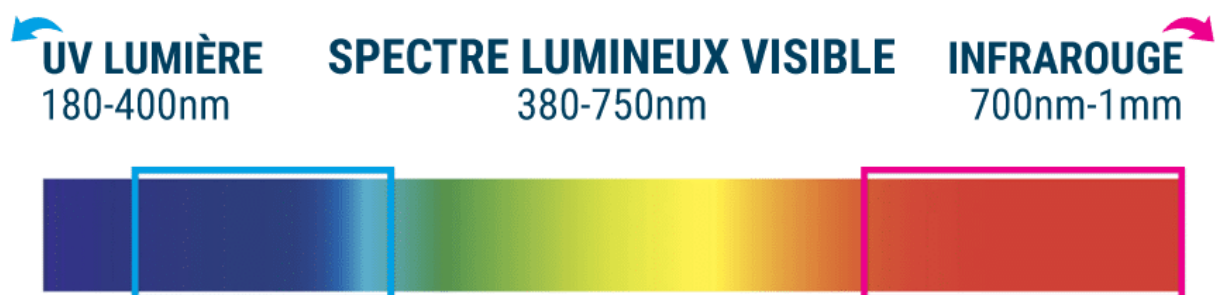


Figure 8: spectre de la lumière

Les UV-C, forme de rayonnement ultraviolet la plus énergétique et la plus dangereuse, sont filtrés efficacement par la couche d'ozone. Les UV-A et les UV-B sont donc les seules radiations ultraviolettes auxquelles sont confrontées les plantes.(Gröbner *et al.*, 2000)

La quantité d'ultraviolets à la surface du globe dépend de plusieurs paramètres (Gröbner *et al.*, 2000) (Diffey, 2002):

- la taille de la colonne d'ozone (stratosphérique ou troposphérique) traversée.
- l'angle du soleil au zénith.
- l'altitude par rapport au niveau de la mer.
- la présence d'aérosols et leurs propriétés optiques.
- la présence de nuages.
- l'albédo.

Dans les milieux montagneux et donc en particulier dans les Alpes, le paramètre clef de compréhension de l'intensité des radiations UV est l'altitude. En effet, plus l'altitude augmente et moins le nombre de molécules d'air, de particules, d'aérosols ou d'ozone sera important, expliquant de fait une moindre absorption des rayonnements UV.(Gröbner *et al.*, 2000)

De manière générale, on peut admettre que la quantité d'UV-B augmente en moyenne de 15 à 25% tout les 1000 mètres d'altitude et la quantité d'UV-A de 7,5 à 12,5%. (Blumthaler, 2005)

Ses valeurs moyennes peuvent néanmoins fortement varier du fait de l'influence d'autres paramètres tels que la quantité d'ozone troposphérique (très présent en été) et l'albédo (fortement dépendant de la couverture neigeuse qui change de manière importante au cours des saisons dans les Alpes) sur la quantité d'ultraviolet.(Gröbner *et al.*, 2000)

Luminosité.

De même que pour les UV, il est généralement admis que l'irradiance solaire dépend de la composition de l'atmosphère et de la quantité de photons absorbés par les aérosols présents dans l'atmosphère.(De La Casiniere *et al.*, 1993)

Avec l'altitude, l'épaisseur de la couche d'atmosphère traversée par les rayons solaires diminue et de fait, l'irradiance solaire augmente avec l'altitude.(De La Casiniere *et al.*, 1993)

En plus de cette augmentation de la luminosité avec l'altitude on constate sur la période d'étude correspondant à la fonte des neiges une augmentation drastique de la luminosité.

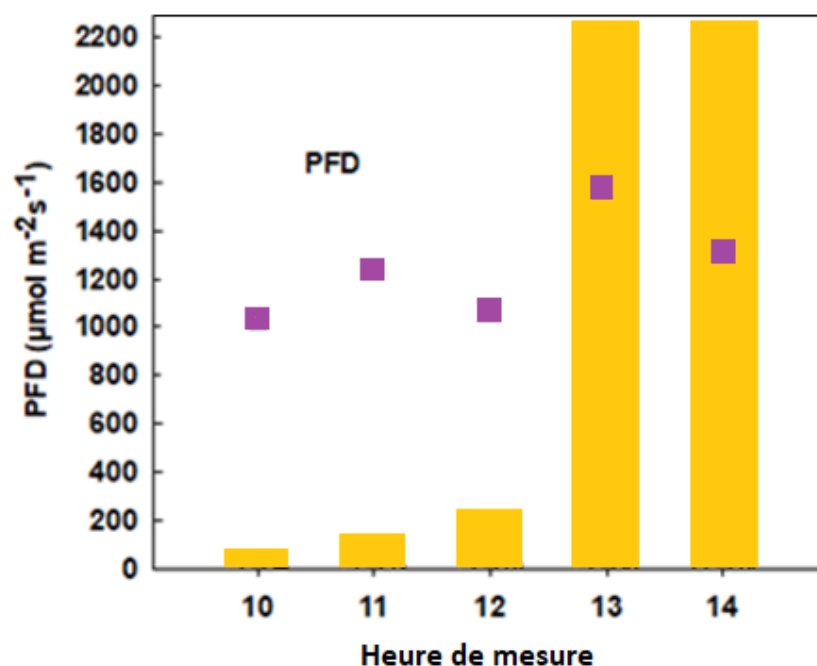


Figure 9: évolution de la luminosité au cours de la fonte des neiges au niveau d'une feuille de *Soldanella alpina* (Streb and Cornic, 2012). Sont figurés en violet les intensités lumineuses moyenne observée au niveau de l'environnement et en jaune les intensités lumineuses au niveau des feuilles.

1.5. Impact du réchauffement climatique.

De 1960 à 2017, la saison des neiges dans les Alpes a diminuée de 38 jours, commençant en moyenne 12 jours plus tard et finissant en moyenne 26 jours plus tôt. (Latnser and Schneebeli, 2003; Kluger, 2017) Il est prédit que le début de la période de dégel se déplace lentement de mai à avril voir même mars. (Kluger, 2017)

Cependant les observations sont très variables d'une année sur l'autre. Si l'hiver 2015-2016 a été exceptionnellement chaud avec une couverture neigeuse en moyenne 20% plus faible par rapport à ce qui était observé les années précédentes, il n'en reste pas moins que cela ne représente pas une tendance uniforme ces dernières années. (Kluger, 2017) Ces 30 dernières années se sont en effet succédés plusieurs hiver peu neigeux, chaud et sec mais également des hiver avec un couvert neigeux important (Schöner *et al.*, 2019), comme j'ai pu le constater sur le terrain de 2017-2018.

L'impact du réchauffement climatique en milieu alpin est difficile à prédire. Si l'évolution des températures est connue, celle du couvert neigeux est difficile à déterminer. Hors au regard de la végétation, le couvert neigeux est un paramètre très important de l'évolution des communautés de plantes alpines. (Schöner *et al.*, 2019)

L'étude de l'évolution du couvert neigeux avec le réchauffement climatique est délicate car la formation de la neige dépend de plusieurs paramètres qui sont (Schöner *et al.*, 2019) :

- la température de l'air
- l'intensité des précipitations (Mankin and Diffenbaugh, 2015)
- l'altitude au dessus du niveau de la mer.

Il semble que la corrélation entre l'intensité des précipitations et l'épaisseur du couvert neigeux soit d'autant plus importante que l'altitude au dessus du niveau de la mer est grande. (Schöner *et al.*, 2019) Cela s'explique par le fait que plus l'altitude est importante et plus les températures sont basses (Faverger and Robert, 1995), permettant à la neige de se former et de se fixer, indépendamment de l'augmentation des températures liée au réchauffement climatique.

Au regard de ce résultat on peut prévoir que le couvert neigeux devrait persister mais de manière plus restreinte, les zones couvertes de neiges se décalant de plus en plus en altitude (Schöner *et al.*, 2019). Les limites des étages subalpins et alpins, ainsi que les végétations qui les caractérisent pourraient donc lentement migrer en altitude au fur et à mesure de l'augmentation des températures globales. (Theurillat and Guisan, 2001)

L'augmentation des températures, la diminution du couvert neigeux et le dégel plus rapide risquent de provoquer d'après les modèles, une augmentation des périodes de sécheresse renforcées par une diminution de l'évapotranspiration. D'autant plus qu'une diminution des précipitations de 18 à 27% est prévue. (CH *et al.*, 2011) A long terme cet effet devrait entraîner un stress hydrique fort pour les plantes alpines et renforcer la diminution du couvert neigeux en hiver. (Confortola *et al.*, 2014)

2. Gestion des stress abiotiques chez les plantes

2.1. Rappel sur la photosynthèse.

La photosynthèse est le procédé par lequel les organismes photosynthétiques utilisent l'énergie lumineuse pour fixer du dioxyde de carbone atmosphérique et produire du glucose et du dioxygène. Ce processus nécessite de l'eau et se fait en deux phases. Une première phase dite « claire » qui est photodépendante et au cours de laquelle la lumière est captée. Suit d'une deuxième phase dite « obscure » car photoindépendante et qui permet la fixation du CO₂.

Au cours de la première phase de la photosynthèse l'énergie lumineuse arrive au niveau du photosystème II. Les photons qui composent la lumière excitent les molécules de chlorophylles présentes dans les antennes des photosystèmes II. Cette excitation se

transmet ensuite de proche en proche jusqu'aux molécules de chlorophylle présentes dans le centre réactionnel. Les centres réactionnels, en se désexcitant, génèrent des électrons qui sont ensuite transportés par le biais de réactions d'oxydoréductions d'accepteurs successifs formant la chaîne de transport linéaire des électrons photosynthétiques. Dans le même temps le photosystème II ayant perdu des électrons, une réaction d'oxydoréduction avec l'eau présente dans les thylakoïdes du chloroplaste se fait par le biais du complexe d'oxydation de l'eau du niveau du PSII qui provoque la libération de dioxygène et la création d'un gradient de proton (en libérant les protons dans le lumen).

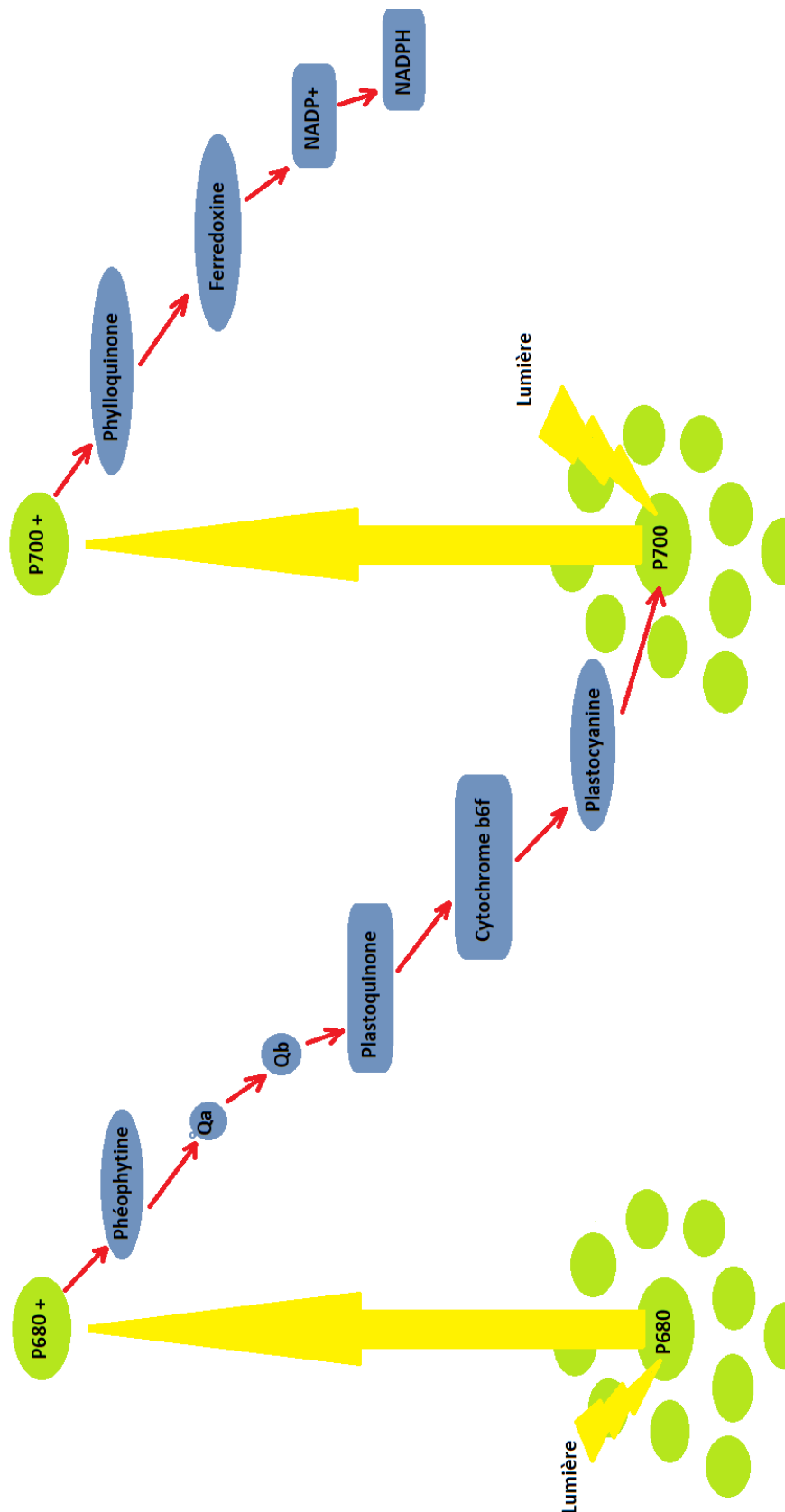


Figure 10: diagramme énergétique, dit diagramme en Z, montrant le transport d'électron le long de la chaîne de transport des électrons photosynthétique en fonction du potentiel oxydoreducteur des différents accepteurs.

Au cours de la chaîne de transfert des électrons photosynthétiques, les électrons passent du PSII à la phéophytine puis à la Quinone A, Quinone B, la plastoquinone puis le cytochrome b6f. Le cytochrome b6f est un complexe protéique qui agit comme une pompe et va permettre de renforcer le gradient de proton dans le lumen. Les électrons eux poursuivent ensuite leur chemin du cytochrome b6f au plastocyanine, au photosystème I. Au niveau du photosystème I, comme pour le PSII, la chlorophylle photoexcitée permet d'augmenter le niveau d'énergie de l'électron transporté. Du PSI, les électrons sont ensuite transportés vers la ferrédoxine au niveau de laquelle se trouve une NADP réductase qui va réduire le NADP⁺ en NADPH et ainsi créer du pouvoir réducteur.

En parallèle le gradient de proton permet à l'ATP synthase de créer de l'ATP.

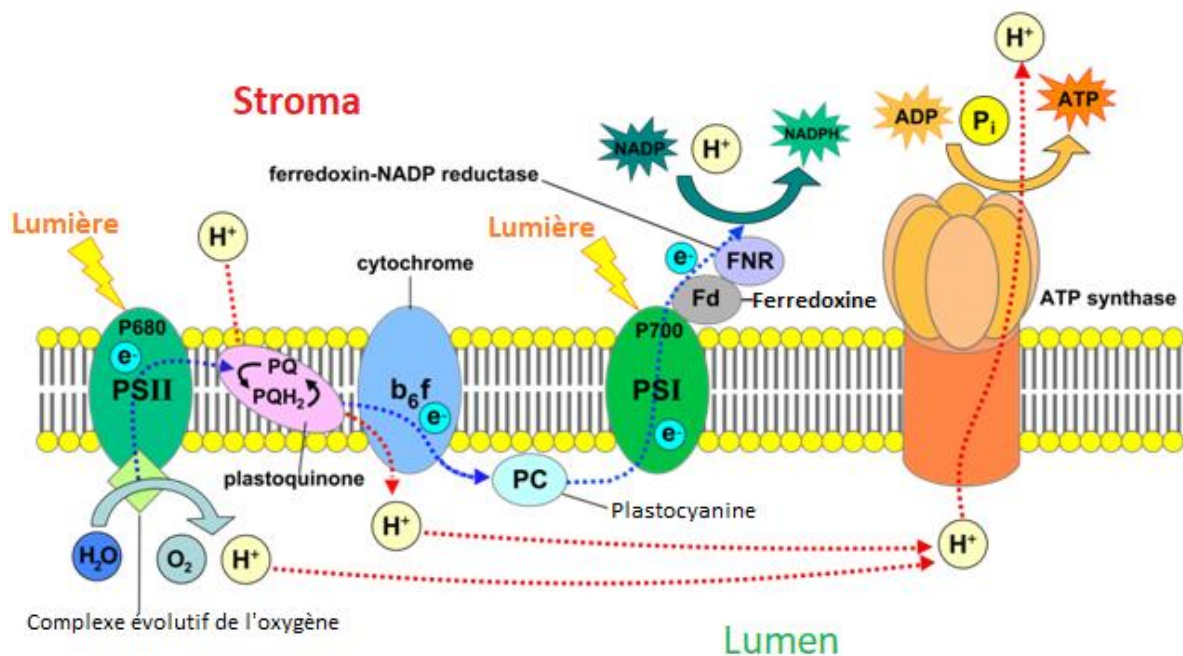


Figure 11: schéma de la chaîne de transport non cyclique des électrons au niveau du chloroplaste (Crée à partir de Powerpoint, et basé sur: Taiz et Zeiger, Plant Physiology, 4th edition, [ISBN 0-87893-856-7](#) - wikipédia)

Au cours de la deuxième phase de la photosynthèse, les organismes photosynthétiques utilisent l'énergie sous forme d'ATP et le pouvoir réducteur sous forme de NADPH créée lors de la première phase pour faire fonctionner le cycle de Calvin-Benson.

Le cycle de Calvin-Benson permet la fixation du dioxyde de carbone atmosphérique sur des molécules de RuBP (Ribulose-1,5-bisphosphate) à l'aide d'une enzyme, la RUBISCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase). Cette première

réaction permet la création de deux molécules de 3-phosphoglycérate qui sont ensuite réduites sous forme de glycéraldéhyde-3-phosphate.

Le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) peut ensuite être exporté dans la cellule et stocké sous forme de glucose, de cellulose ou d'amidon.

Le reste du cycle de Calvin-Benson permet la régénération du RuBP.

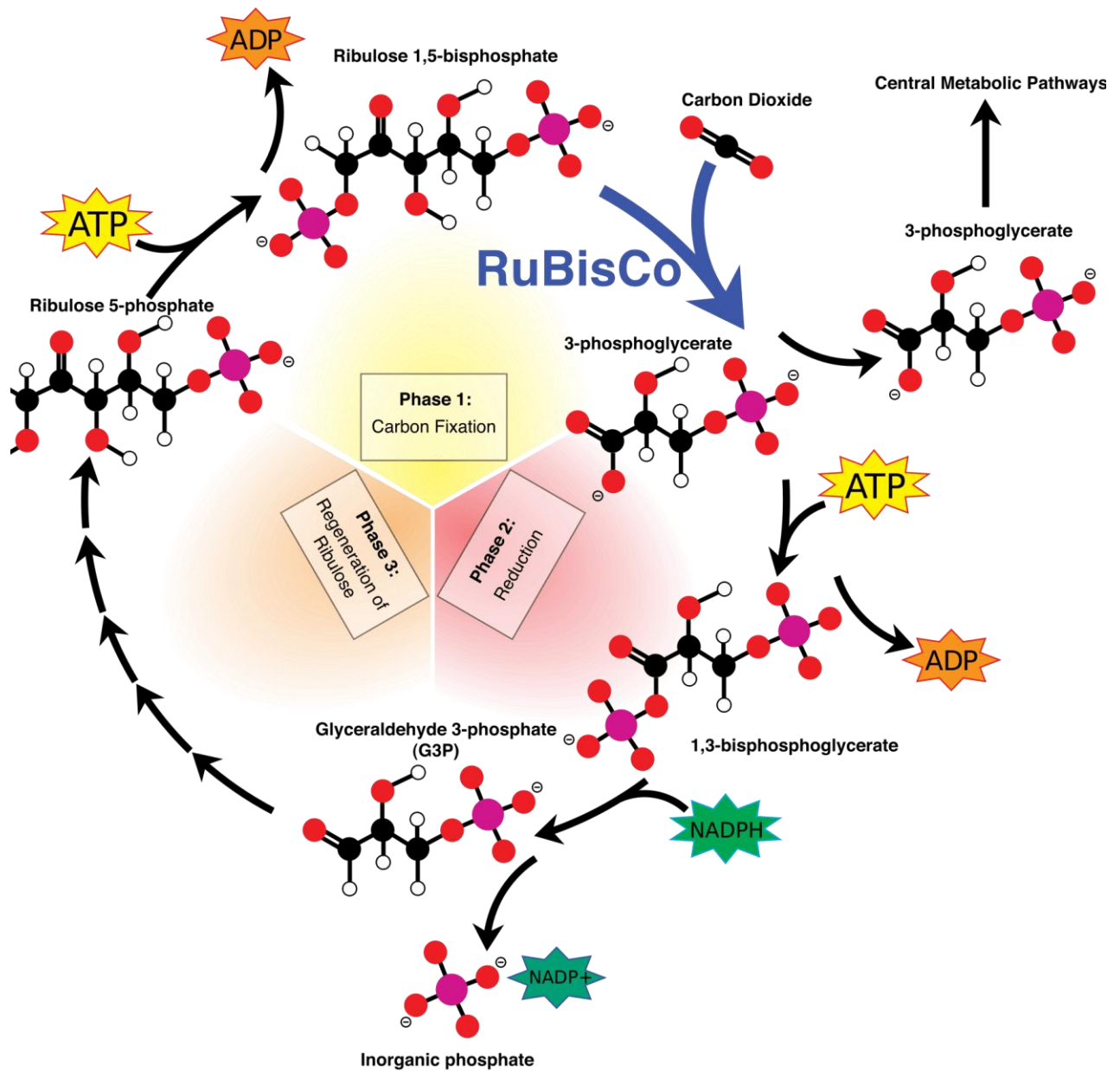


Figure 12: Schéma du cycle de Calvin-Benson, © Mike Jones, Wikimedia CC by-sa 3.0

2.2. Conséquences des stress abiotiques alpins

2.2.1. Effets d'un excès de lumière.

Comme vu dans le paragraphe 2.3., on retrouve dans les Alpes des intensités lumineuses importantes. Ces intensités lumineuses fortes, dues à un ensoleillement important, s'accompagnent de radiations infrarouges et sont à l'origine de trois types de stress : un stress oxydant, un stress thermique et un stress hydrique. (Levitt, 1980)

En effet, avec l'augmentation des radiations reçues au niveau de la feuille, il arrive d'avantage de photon au PSII. Ces photons sont ensuite pour partie convertie en un flux électronique qui permet d'alimenter le cycle de Calvin (comme vu en 3.2). Hors la vitesse du cycle de Calvin, ce dernier étant un ensemble de procédé enzymatique, atteint un plateau passé une certaine quantité de lumière. Passée cette intensité lumineuse dite saturante, si la lumière en excès n'est pas dissipée il y a trop d'électrons créés au niveau du PSII par rapport aux nombres d'électrons pouvant être effectivement pris en charge au niveau du cycle de Calvin. Les électrons excédentaires, à défaut de pouvoir trouver un accepteur au niveau de la chaîne de transport linéaire des électrons de la photosynthèse, vont être acceptés par le dioxygène et ainsi créer un stress oxydant. Sous l'effet d'intensités lumineuses trop importantes, les chlorophylles peuvent également s'exciter sous forme de triplet de chlorophylle et générer pour se désexciter des espèces réactives de l'oxygène.

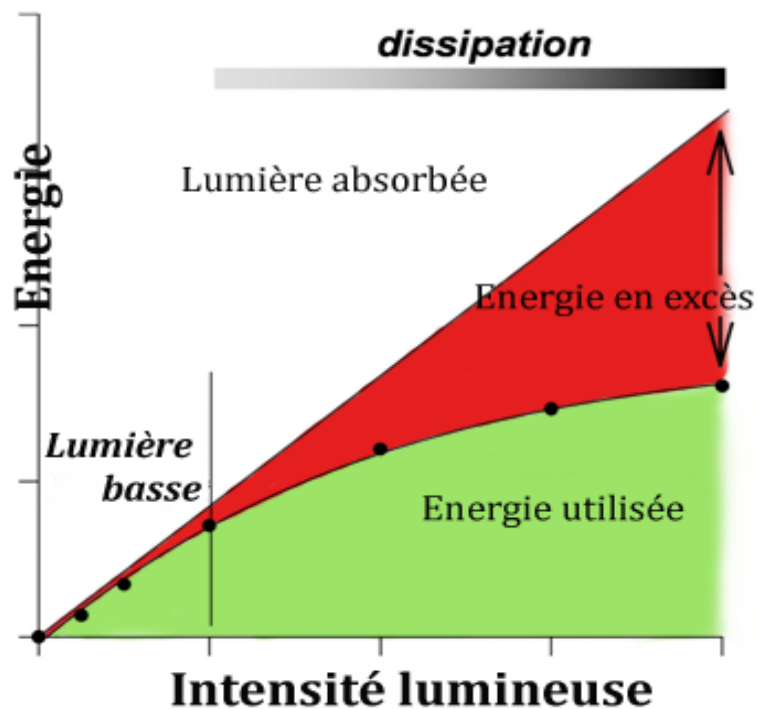


Figure 13: schéma représentant la quantité d'énergie générée en fonction de l'intensité lumineuse chez une plante d'après (Ruban *et al.*, 2012)

Le stress thermique, qui vient de l'échauffement de la feuille due aux radiations lumineuses et infrarouge reçues, va amplifier le stress thermique et, si les températures au niveau de la feuille sont très fortes, en ralentissant d'avantage le cycle de Calvin (cf 3.2.4). Quand au stress hydrique, il est causé par une évapotranspiration importante sous l'effet de l'augmentation de la température des feuilles. Pour limiter cette évaporation, les stomates vont alors se fermer, limitant de fait la perte d'eau mais également l'entrée de CO₂. La diminution du flux entrant du CO₂, substrat principal de la photosynthèse, va également participer au ralentissement du cycle de Calvin et donc amplifier le stress oxydant.

2.2.2.Effet des radiations UV.

Les radiations UV, comme vu au paragraphe 2.3. sont des radiations hautement énergétiques dont les effets sont multiples. (Levitt, 1980) Cependant il est difficile de discriminer précisément les dommages dus spécifiquement aux UV-A ou aux UV-B.

Les UV-B, du fait de leur longueur d'onde plus faible, sont plus nocifs que les UV-A. Dans la littérature on trouve l'approximation suivante : UV-A contribuent pour 20% des dommages contre 80% pour les UV-B. (Diffey, 2002).

Les radiations ultraviolettes peuvent entrainer une photo-oxydation des acides nucléiques composant l'ADN, pouvant causer des mutations. (Jiang and Taylor, 1993) Elles entraînent également une peroxydation des lipides, perturbent les membranes et créent un stress oxydant (Kramer *et al.*, 1991)

Les acides aminés et les protéines, qui absorbent fortement à 280nm, sont également sensibles aux rayonnements UV. Certains acides aminés en particuliers sont particulièrement sensibles à la photo-oxydation et peuvent être détruit alors que les ponts disulfures, essentiels à la conformation des protéines, peuvent être affectés. (Hollósy, 2002)

De part cette sensibilité des protéines aux UV, mais également l'absorbance UV forte des plastoquinones et du manganèse(Szilárd *et al.*, 2007), résulte en la diminution des activités d'un grand nombre d'enzymes essentielles au bon fonctionnement d'une plante. On peut notamment noter une diminution de l'activité de la Rubisco, de l'ATP synthase (Strid *et al.*, 1990), de la violaxanthine dé-époxydase (Pfündel *et al.*, 1992), de la catalase (Aubailly *et al.*, 2000), et des photosystèmes I et II (Vass *et al.*, 2005; Szilárd *et al.*, 2007; Albert *et al.*, 2011). Cela combiné, engendre une diminution de l'efficacité de la photosynthèse de façon générale (Albert *et al.*, 2011). A titre d'exemple, la plante

Vaccinium uliginosum que l'on retrouve au Groenland, voit sa photosynthèse inhibée de 23% du fait de la présence d'UV. (Albert *et al.*, 2008)

Les radiations ultraviolettes ont également un effet destructeur sur les pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle et les caroténoïdes. (Strid *et al.*, 1990)

En conclusion, la présence d'ultraviolet en quantité importante dans le milieu entraîne de nombreux effets négatifs notamment du à la photo-oxydation des différents composants des cellules. La diminution de l'activité des enzymes clefs de la photosynthèse, la photoinhibition des photosystèmes et la destruction des pigments chlorophylliens entraînent une diminution de la capacité photosynthétique de la plante, responsable d'une diminution de sa croissance. (Hollósy, 2002)

2.2.3.Effet des températures extrêmes

Température basse

A basse température les deux effets majeurs sont la rigidification des membranes et la diminution des activités enzymatiques. La rigidification des membranes découle d'un changement dans la composition lipidique de celle-ci (Quinn, 1985) et dans le fait qu'avec le froid l'agitation moléculaire diminue. La diminution des activités enzymatiques vient du fait que ces réactions sont fortement dépendantes des températures. (Peterson *et al.*, 2007).

Pour ce qui est de la photosynthèse cette diminution des activités enzymatiques est problématique. En effet, la première phase de la photosynthèse, au cours de laquelle la lumière du soleil est captée et transmise par le biais de réaction d'oxydoréduction est peu sensible à la température. Ainsi les électrons vont circuler le long de la chaîne de transport des électrons jusqu'à former de l'ATP et du NADPH. En revanche les activités de la Rubisco et des autres enzymes du cycle de Calvin sont diminuées à basses température. L'assimilation du CO₂ se fait donc plus lentement. La dissymétrie entre les deux phases de la photosynthèse entraîne une diminution de la quantité de Phosphate inorganiques présent dans les chloroplastes. La génération de l'ATP se fait plus lentement car sa consommation est également plus lente. La formation de NADPH étant également enzymatique, elle va aussi être ralentie. Les électrons, qui permettaient la réaction d'oxydoréduction nécessaire à la formation de NADPH, sont alors plus susceptibles d'être acceptés par le dioxygène que par les accepteurs de la chaîne de transport des électrons. Hors en étant acceptés par le dioxygène cet excès d'électrons entraîne la création de ROS (Robert and Aubrey, 1987a, b).

A basse température il y a donc une diminution de la photosynthèse et une augmentation du stress oxydant.

Température haute

A hautes températures, les protéines ont tendances à se dénaturer. Pour les enzymes, cela signifie une perte de fonction ou du moins, une diminution de leur activité. (Peterson *et al.*, 2007).

Pour ce qui est des plantes, on observe de façon notable une diminution de la photosynthèse et une génération de ROS. A titre d'exemple, il a été mesuré que la température optimale pour la photosynthèse chez la plante alpine *Ranunculus glacialis* était comprise entre 15 et 35°C. (Streb and Cornic, 2011) Pour des températures plus élevées, l'efficacité de la photosynthèse est dramatiquement impactée et au-delà de 39°C elle est complètement inactivée. (Larcher *et al.*, 1998)

La photosynthèse diminue pour plusieurs raisons. Tout d'abord, à fortes températures la transpiration des plantes augmente et pour éviter des pertes d'eau trop importantes, une des premières réponses est généralement la fermeture des stomates. Cette réponse, si elle permet de diminuer efficacement la transpiration, est responsable d'une diminution de la disponibilité en CO₂ dans les cellules et dans les chloroplastes.

Ensuite, il est également connue que le PSII est thermolabile et qu'en temps que tel, son activité est négativement impactée si les températures sont trop élevées. Ainsi les centres réactionnels du PSII sont moins efficaces et le complexe d'oxydation de l'eau se dissocie et devient inactif quand les températures sont trop élevées.

Pour finir, les enzymes du cycle de Calvin sont sensibles elles aussi à la chaleur. Notamment la Rubisco (Galmés *et al.*, 2013) qui a tendance à se dégrader plus rapidement et dont l'activité diminue du fait de l'inhibition par les hautes températures de la Rubisco activase qui lui permet d'être active.

Si le cycle de Calvin est ralenti et que l'on a un déséquilibre au niveau du PSII entre le flux d'électrons allant vers le PSI et l'activité du complexe d'oxydation de l'eau, de la même façon que pour des températures basses, il y a un risque plus grand d'avoir des électrons acceptés par le dioxygène plutôt que par les accepteurs par lesquels ils devraient passer si la photosynthèse fonctionnait normalement. Cela crée ainsi un stress oxydant.

2.2.4.Synthèse.

Le stress oxydant provient de l'acceptation des électrons, au niveau de la chaîne de transport non cyclique, par le dioxygène. Ainsi, même dans des conditions non stressantes, il y a une génération de ROS mais celle-ci est équilibrée par les capacités antioxydantes de la plante et les ROS sont ainsi détoxifiés. Dans ces conditions, il est même admis que la génération de ROS joue, à faible concentration, un rôle clef dans le développement des plantes (Malik *et al.*, 2013; Waszczak *et al.*, 2018). En cas de stress biotiques néanmoins, le déséquilibre entre le flux électronique total et les capacités de fixation du CO₂ (Lütz, 2010, 2013) augmente cette génération de ROS qui ne peuvent être pris en charge par le système antioxydant. Cet excès peut alors devenir problématique et même être létal. Mais cela peut également être un signal permettant d'enclencher de multiples réponses pour limiter ce stress oxydant et de le prendre en charge. C'est par ce biais que la plante s'acclimate et s'adapte si la réponse est suffisante ou senesce si la réponse ne l'est pas. (Baxter *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2017)

Parmi les réponses possibles, il est possible pour les plantes d'opter pour différentes tactiques.

A court terme, la production de ROS peut être limitée par une modulation de la physiologie de la plante. Une augmentation de la dissipation de l'énergie excédentaire sous forme de chaleur (NPQ) ou une diminution du flux électronique total par le biais d'une photoinhibition sont des stratégies efficaces et rapides à ce regard. Dans certains cas, comme chez *T.salsuginea*, des voies alternatives (PTOX, valve malate, cycle de Mehler,...) permettent également de dissiper le flux électronique excédentaire. (Stepien and Johnson, 2009)

A moyen terme, par le biais de cascades enzymatiques ou de l'induction de gènes impliqués dans la résistance aux stress (Choudhury *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2017), la plante peut augmenter ses capacités anti-oxydantes et acclimater sa physiologie ce qui permet de limiter le déséquilibre entre le flux électronique total et les capacités d'utilisation de celui-ci, soit en augmentant le quenching photochimique (photorespiration ou photosynthèse) soit en limitant le flux électronique total.

Enfin, à long terme l'anatomie de la plante peut être modifiée en réponse au stress par le biais de modulation du développement de la plante.(Baxter *et al.*, 2013)

De façon générale, les plantes alpines ne sont pas confrontées uniquement à un stress abiotique de manière isolée mais plutôt à plusieurs stress concomitants. En effet,

si l'on prend comme exemple la période de désenneigement qui m'a intéressé tout au long de ma thèse, les plantes sont tout d'abord soumises à des températures basses (due à la présence de neige ou à l'eau glaciale issue du dégel) en même temps qu'une luminosité importante et une grande quantité d'UV. Plus tard quand le désenneigement est fini, elles subissent des températures élevées assorties cette fois encore d'une grande quantité d'UV et d'une luminosité importante. Cela peut être à l'origine d'un stress oxydant très important malgré le fait qu'un grand nombre de réponses aux stress abiotiques et aux stress oxydant soient communes.(Choudhury *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2017).

Réponse à des stress abiotiques:

- chaleur
- froid
- stress hydrique
- Excès de luminosité
- UV

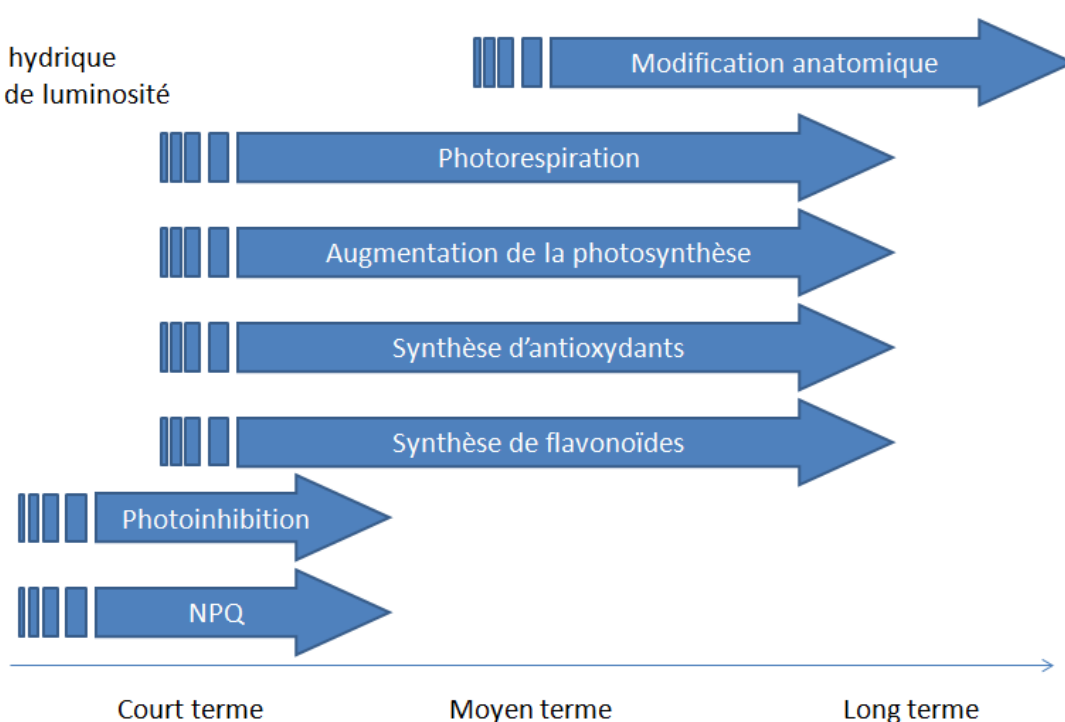


Figure 14: Schéma récapitulatif des réponses à des stress abiotiques à court, moyen et long terme chez les plantes.

2.3. Adaptation morphologiques connues des plantes alpines.

Il existe de nombreuses adaptations morphologiques communes aux plantes alpines.

De façon générale, les plantes alpines semblent être généralement de plus petite taille, elles occupent une surface au sol plus faible et sont plus ramassée (Körner *et al.*, 1989), ce qui contribue à créer un microclimat protecteur au niveau de la plante en cela que l'énergie thermique suite à l'exposition de la plante à la lumière peut ainsi être plus facilement stockée. (Körner and Cochrane, 1983)

Les feuilles des plantes alpines, ont aussi des différences notables en comparaison à leur cousines poussant à de plus faibles altitudes : elles sont de manière générale beaucoup plus petites et également plus épaisses. (Körner *et al.*, 1989)

Cette augmentation de l'épaisseur des feuilles des plantes alpines s'explique par deux facteurs. Premièrement, il y a une augmentation de l'épaisseur des tissus photosynthétiques de la feuille de l'ordre de 70% pour le parenchyme palissadique et de 37% pour le parenchyme lacuneux. De plus, on note que de manière générale, les feuilles des plantes alpines tendent à avoir une couche de parenchyme palissadique supplémentaire. Cela est sans doute une façon de compenser la petitesse des feuilles au regard de la productivité photosynthétique, d'autant plus que les plantes alpines possèdent proportionnellement à la taille de leur feuille, une surface mésophyllienne plus importante. Deuxièmement, les parois cellulaires sont également plus épaisses chez les plantes alpines, ce qui participe à l'augmentation globale de l'épaisseur des feuilles. (Körner *et al.*, 1989) La cuticule est notamment plus épaisse ce qui participe à la protection des feuilles contre les UV, les intensités lumineuses importante et la dessiccation.

Avec l'altitude, le nombre de stomates augmente, notamment sur la face adaxiale (Körner *et al.*, 1989). Par ailleurs, on retrouve une proportion plus importante de plantes amphistomatiques dans les Alpes. Cela est dû à une diminution de la pression partielle en oxygène et à l'augmentation de l'épaisseur des feuilles. En effet, l'égale répartition des stomates sur les deux faces de la feuille, ainsi que leur plus grand nombre garantie une meilleure diffusion du CO₂ pour la photosynthèse.

A l'échelle cellulaire, on note la présence de protrusions au niveau du chloroplaste et des peroxysomes. Les protrusions sont des extensions du chloroplaste, remplis de stroma qui semble se former préférentiellement chez les plantes poussant dans des environnements froids, notamment quand la période végétative des plantes en question est courte. (Buchner *et al.*, 2007).

Pour ce qui est des plantes qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse, on peut par exemple noter la présence de protrusions chez *Geum reptans* (une cousine de *Geum montanum*) et chez *Soldanella alpina*. En revanche, on n'observe pas de protrusions chez *Geum montanum*.

2.4. Adaptations et acclimatation physiologique des plantes aux stress alpins.

2.4.1. Photoinhibition

La photoinhibition se caractérise par un ralentissement de la photosynthèse due à une diminution du rendement quantique du PSII (qui se trouve alors inférieur à la norme pour une plante en bonne santé, situé à environ 0.8).

La photoinhibition peut tout d'abord être un symptôme d'un stress : comme vu dans les paragraphes 3.3.1. et 3.3.3., un stress lumineux ou thermique peut affecter la photosynthèse en la ralentissant directement ou indirectement et générer un stress oxydant. Les radicaux d'espèces réactives de l'oxygène, en plus de s'attaquer aux lipides, à l'ADN ou à l'ARN, peut également s'attaquer aux protéines. Et notamment aux protéines impliquées dans la photosynthèse comme les protéines des photosystèmes II et I, très sensible.

Cependant, cette photoinhibition peut également être contrôlée et modulée par la plante dans le but de conserver une photosynthèse efficace tout en limitant les excès d'électrons. Elle peut ainsi être utilisée comme une stratégie pour limiter le stress oxydant (Yugo *et al.*, 2019).

Chez les plantes alpines en revanche, il est souvent noté une très forte résistance à la photoinhibition : même en condition considérées comme stressante, la photoinhibition est limitée (Streb *et al.*, 1997; Inan *et al.*, 2004; Hacker and Neuner, 2006). Cela peut s'expliquer par le fait que si la photoinhibition, quand elle est contrôlée, permet en effet de limiter les dommages oxydatifs, elle affecte néanmoins négativement la capacité des plantes à faire de la photosynthèse. Pour les plantes alpines qui doivent se développer pendant une période végétative très courte du fait du climat, la diminution des capacités photosynthétiques, même dans le but de se prémunir des ROS semble être un sacrifice trop important.

Ainsi, si la photoinhibition est évitée, que ce soit comme conséquence d'une mauvaise répartition des électrons ou d'un stress oxydant, ou que ce soit comme réponse aux stress, d'autres stratégies visant à dissiper l'énergie excédentaire doivent être mises en place.

2.4.2. Système antioxydant

De nombreuses études se sont intéressées aux systèmes antioxydants des plantes alpines. Et elles tendent à montrer qu'en la matière les plantes sont très bien équipées et disposent d'un système antioxydant très efficace mais dont la composition varie selon les espèces. (Lütz, 2010)

La production d'un système antioxydant fort pour survivre en climat alpin semble être d'avantage une acclimatation qu'une adaptation. En effet des études s'intéressant aux capacités antioxydantes des plantes alpines en fonction de l'altitude ont montré que plus l'altitude est élevée plus les capacités antioxydantes d'une plante étaient importantes.(Wildi and Lütz, 1996; Ren *et al.*, 1999). Il existe également une variation diurne de la quantité d'antioxydant qui semble indiquer que les plantes alpines sont capables de synthétiser rapidement des antioxydants quand les conditions l'exigent.

L'étude de (Wildi and Lütz, 1996) s'attache à comparer les capacités antioxydantes de 9 plantes alpines au travers de l'étude de quatre antioxydants bien connus et étudiés : l'acide ascorbique et le glutathion, que l'on retrouve majoritairement dans les compartiments cellulaires, ainsi que le tocophérol et les β -carotènes qui protègent d'avantage les membranes. En plus de remarquer que la capacité antioxydante des plantes étudiées augmente avec l'altitude, ils ont également mis en évidence le fait que c'est surtout pour l'ascorbate que les plus grandes variations sont observées.

D'autres études se sont intéressées à d'autres acteurs du système antioxydant tels que la catalase. La catalase est une enzyme antioxydante qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène. Elle est présente dans le cytoplasme comme dans les chloroplastes ou des organites spécialisés comme les peroxysomes. Cette enzyme est normalement photoinhibée mais chez *Homogyne alpina* la catalase est dix fois plus stable et résistante à la photoinhibition par rapport aux autres plantes.(Streb *et al.*, 1997). Cette insensibilité à la lumière de la catalase chez *H.alpina* est remarquable dans la mesure où on ne la retrouve pas chez d'autres plantes alpines poussant dans les mêmes conditions et elle s'explique par le fait que la catalase s'accumule et se cristallise dans les peroxysomes.(Engel *et al.*, 2006)

Si la résistance de la catalase chez *H.alpina* est unique, on peut néanmoins noter que chez les plantes alpines de manière plus générale, la catalase a tendance à s'accumuler d'avantage que chez les plantes non-alpines, formant parfois des cristaux comme chez *H.alpina*.(Lütz, 2010)

2.4.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques que l'on retrouve chez les plantes notamment au niveau de la cuticule, de l'épiderme et du mésophyle. Il semble néanmoins que ce soit au niveau de l'épiderme ; plus précisément dans les vacuoles, les parois cellulaires et les trichomes des cellules épidermiques ; que les flavonoïdes s'accumulent le plus.(Winkel-Shirley, 2002; Agati *et al.*, 2012)

Les flavonoïdes ont de nombreux rôles chez les plantes. Dans les fleurs c'est eux, notamment les flavonoïdes de la classe des anthocyanes, qui sont responsables des différentes couleurs que l'on observe dans la nature.(Quattrocchio *et al.*, 2006)

Les flavonoïdes ont, chez les fruits, un rôle antioxydant particulièrement bien connu et étudié en raison des multiples bénéfices des flavonoïdes dans la prévention d'un certain nombre de pathologies(Yao *et al.*, 2004).

Dans les feuilles, il semble également que les flavonoïdes aient aussi un rôle antioxydant et permettent ainsi à la plante de limiter les dommages dus aux ROS (Agati and Tattini, 2010; Agati *et al.*, 2012; Agati *et al.*, 2013).

Les flavonoïdes sont induits par les UV-B (Rozema *et al.*, 1997; Agati *et al.*, 2013) mais également par l'intensité lumineuse de manière générale (Laureau *et al.*, 2015b). Compte tenu de la variation de l'intensité lumineuse et de la quantité d'UV le long d'un gradient altitudinal dans les Alpes, il est alors normal que l'on observe une augmentation de la quantité de flavonoïdes avec l'altitude(Filella and Peñuelas, 1999). Ils auraient également un rôle d'écran protecteur contre les UV. Chez certaines plantes alpines, comme celles appartenant au genre *Verbascum*, il semble qu'une fraction importante des ressources est allouée à la création d'un écran solaire préformant par le biais d'une augmentation de la concentration de flavonoïdes dans les trichomes, sortes de poils présent à la surface des feuilles. (Karabourniotis *et al.*, 1992) Chez la plante alpine *Soldanella alpina*, une forte concentration des flavonoïdes au niveau de l'épiderme contribuerait à protéger la plante contre la photoinhibition du PSII(Laureau *et al.*, 2015b)

Outre la quantité d'UV et l'intensité lumineuse, il semble que le froid et le couvert neigeux(Lütz *et al.*, 2005; Wolfgang *et al.*, 2007) puissent également expliquer des variations de la quantité de flavonoïdes chez les plantes.

2.4.4. Quenching non photochimique

Le quenching non photochimique, noté NPQ, est une voie de dissipation de l'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. C'est la réponse la plus rapide des plantes à une exposition à une énergie lumineuse excédentaire.

Le NPQ dépend de 3 paramètres :

- Le ΔpH
- Le cycle des xanthophiles
- La présence de la protéine Psbs

Le NPQ est un moyen de dissipation de l'énergie lumineuse excédentaire majeur chez les plantes arctiques (Jones and H W M Demmers-Derks, 1999; Pérez-Torres *et al.*,

2004). Les plantes arctiques ne sont pas soumises exactement aux mêmes conditions climatiques que les plantes alpines. Néanmoins, il existe des similitudes notamment pour ce qui est de la période de végétation courte, de l'intensité lumineuse élevée et extrêmement fluctuante, ainsi que des températures basses.

Des études ultérieures, cette fois plus spécifiquement faites sur les plantes alpines montrent que la dissipation d'énergie excédentaire sous forme de chaleur est également une stratégie existante chez les plantes alpines. (Germino and Smith, 2000) qui ont travaillé sur deux plantes alpines poussant à 3250m d'altitude dans le Wyoming notent qu'à cette altitude les plantes sont fréquemment confrontées à des gelées nocturnes et doivent donc survivre malgré des variations brutales à la fois en terme de températures et d'intensités lumineuses. Chez *Caltha leptosepala* et *Erythronium grandiflorum*, on retrouve un NPQ élevé qui selon les auteurs permettrait de protéger les plantes d'une excitation trop importante au moment du dégel (alors que la luminosité est élevée mais les températures encore basse.).

Soldanella alpina et *Ranunculus glacialis*, étudiées dans les Alpes françaises montrent également un NPQ important (plus marqué dans le cas de *Soldanella alpina* que dans le cas de *Ranunculus glacialis*) qui leur permettrait de mieux faire face aux contraintes de leur environnement.(Streb *et al.*, 1998)

2.4.5. Voies alternatives.

La plastide terminale oxidase (PTOX)

La PTOX (Plastide Terminal Oxydase) est une protéine chloroplastique mise à jour et caractérisée par Pierre Carol et Marcel Kuntz à la suite de l'étude d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* nommé *Immutans*.

Immutans présente un phénotype singulier avec des feuilles panachées vertes et blanches. Les secteurs verts correspondent à des cellules WT dans lesquels le développement des chloroplastes se fait normalement. Sur les secteurs blancs en revanche, il y a une accumulation de phytoène, peu de caroténoïdes et pas de chloroplastes.

Le phytoène est un précurseur des caroténoïdes en général et notamment du beta-carotène et des xanthophylles. L'accumulation du phytoène dans les secteurs blancs de *Immutans* est due à un défaut dans la production des caroténoïdes qui s'effectue certes mais pas de façon optimale. Les caroténoïdes ayant un rôle important dans la photoprotection des feuilles, c'est leur faible présence chez *Immutans* qui est

responsable du phénotype observé : les secteurs blancs résultant d'un photoblanchiment des secteurs exposés à de fortes intensités lumineuses.

La synthèse des caroténoïdes à partir de phytoène se fait par le biais de deux enzymes : la Phytoène désaturase (PDS) et la ξ -carotène désaturase (ZDS). L'activité de ces enzymes dans le chloroplaste ne peut se faire sans cofacteur et est dépendante de l'état redox du pool de plastoquinone. Si dans un chloroplaste mature, l'état redox du pool de plastoquinone est contrôlé par le cytochrome b6f, ce n'est pas le cas dans le premier stade de développement des feuilles. Dans les jeunes feuilles, c'est une autre protéine qui permet ainsi la réoxydation du pool de plastoquinone.

L'étude génétique de *Immutans* montre la présence d'une mutation au niveau d'un gène IMMUTANS dont la séquence est analogue à celle codant pour l'Alternative Oxydase mitochondriale. La protéine codée par IMMUTANS, nommée PTOX, a elle aussi une fonction de quinone-oxygène oxydoréductase. C'est elle qui permet la réoxydation du pool de quinone nécessaire au fonctionnement de PDS et ZDS au cours du développement de la feuille. PTOX semble également avoir plus largement un rôle dans la formation des chloroplastes et notamment dans l'organisation des thylakoïdes. C'est également ce qui explique l'absence de chloroplastes chez *Immutans*.

De part le fait que la PTOX peut permettre la réoxydation du pool de quinone, cette protéine peut avoir un rôle de valve de sécurité. Elle permettrait ainsi de dissiper des électrons du transport linéaire en excès en les utilisant pour réduire le dioxygène sous forme d'eau. PTOX participe alors à la chlororespiration.

L'implication de PTOX dans la résistance de certaines plantes aux stress abiotiques a été étudiée dans le cas du stress hydrique (Ghotbi-Ravandi *et al.*, 2019), du stress salin (Stepien and Johnson, 2009; Wicjarz *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2017) et du stress thermique chaud (Quiles 2006; Tallón and Quiles 2007 (Diaz *et al.*, 2007) ou froid (Ivanov *et al.*, 2012) couplé à des luminosités importantes (Quiles, 2006; Tallón and Quiles, 2007).

Pour ce qui est des plantes alpines, il a été mis en évidence que la PTOX joue également un rôle, du moins pour quelques espèces comme la Renoncule des glaciers, *Ranunculus glacialis* (Streb *et al.*, 2005; Laureau, 2012; Laureau *et al.*, 2013).

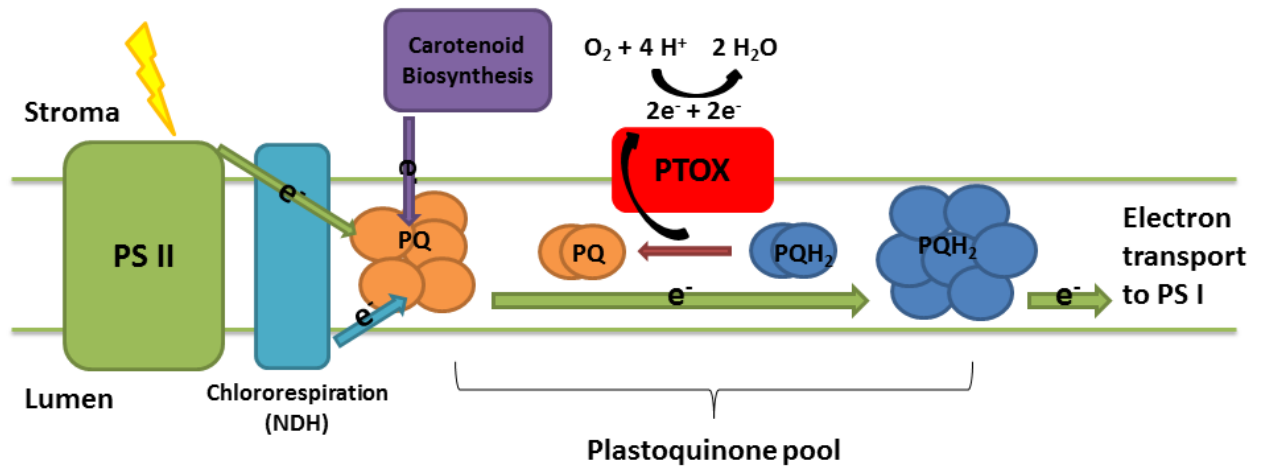


Figure 15: Schéma représentatif du rôle de PTOX chez la plante. La PTOX est une protéine située dans la membrane et qui permet l'oxydation du pool de plastoquinone. Elle participe également à la synthèse de caroténoïdes (d'après Wikipédia ©Tanakeame, [CC BY-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/))

Le transport cyclique

Le transport cyclique des électrons, à l'inverse du transport linéaire, ne va pas acheminer les électrons dans le but de créer du pouvoir réducteur en synthétisant du NADPH. Le transport cyclique permet au PSI d'utiliser les électrons de la chaîne de transport pour faire fonctionner la pompe à proton et renforcer le différentiel de pH entre le stroma et le lumen. Cette utilisation alternative des électrons peut éviter la création d'un stress oxydant tout en favorisant la création d'énergie sous forme d'ATP.

Le renforcement du différentiel pH entre le stroma et le lumen permet également de favoriser la dissipation d'énergie excédentaire sous forme de chaleur (NPQ).

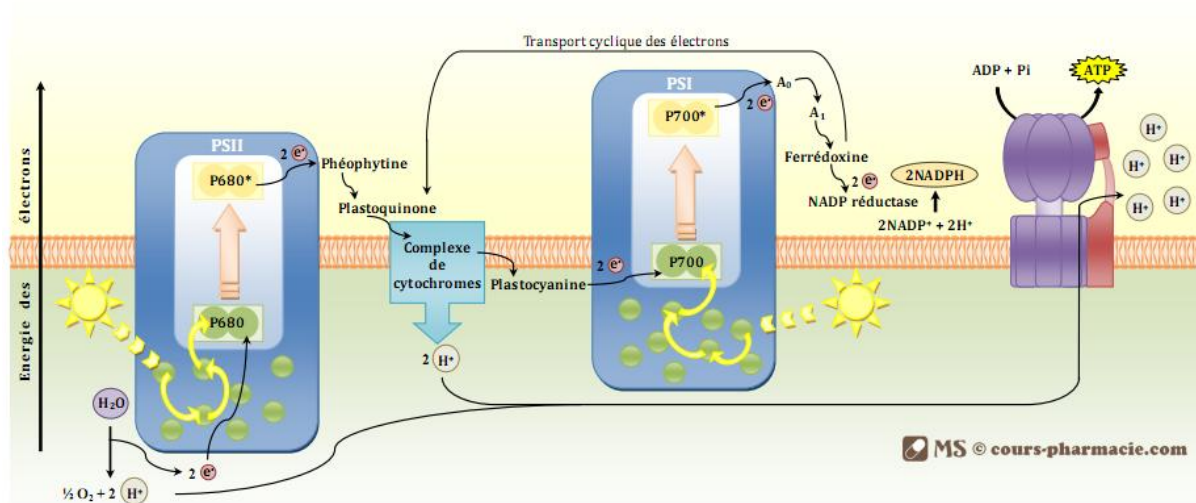


Figure 16: Schéma représentatif du transport cyclique au niveau du PSI (issue de <https://www.cours-pharmacie.com/>)

Cette stratégie semble être favorisée pour limiter la photoinhibition chez *Geum montanum* (Manuel *et al.*, 1999).

La photorespiration.

La photorespiration est le processus par lequel la Rubisco fixe le dioxygène, pour lequel elle a également une affinité, à la place du CO₂. Cette activité oxygénase de la Rubisco utilise de l'ATP et du NADPH pour produire du CO₂, du 2-phosphoglycérate et du 3-phosphoglycérate. (Cockburn, 1983)

La photorespiration a longtemps été vue comme un processus parasite de la photosynthèse ayant pour conséquence une diminution de l'efficacité de celle-ci de 30 à 50% en fonction des conditions environnementales et des espèces considérées. (Kobza and Edwards, 1987; Bauwe *et al.*, 2012; Busch *et al.*, 2013) De plus elle contribue à la production de ROS sous la forme de peroxyde d'hydrogène et produit un composé toxique, le 2-phosphoglycérate, que la cellule doit alors traiter. (Cockburn, 1983)

Cependant, ces dernières années, cette vision de la photosynthèse comme « mal nécessaire » a été nuancée par l'observation d'un effet positif de la photorespiration sur les plantes confrontées à des stress abiotiques. (Brestic *et al.*, 1995; Wingler *et al.*, 2000a; Voss *et al.*, 2013) L'action oxygénase de la Rubisco, du fait qu'elle produit du CO₂ et consomme de l'énergie et du potentiel réducteur, permet de suppléer à un déficit de CO₂ et à désengorger la chaîne de transport des électrons. Les ROS, principalement le peroxyde d'hydrogène, générés par la photorespiration sont pris en charge par la catalase présente dans les peroxysomes. (Foyer *et al.*, 2009)

Cela a pu être mis en évidence pour des stress abiotiques très variés : stress salin (Mittova *et al.*, 2003; Abogadallah, 2011; Yu *et al.*, 2011), stress hydrique (Haupt-Herting and Fock, 2002; Guan *et al.*, 2004), stress lié à des températures basses (Guo *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007) et stress aux métaux lourds. (Cai *et al.*, 2011)

Chez les plantes alpines il existe quelques arguments en faveur d'un rôle de la photorespiration comme mécanisme de mitigation du stress ainsi que documenté par (Heber *et al.*, 1996; Manuel *et al.*, 1999; Wingler *et al.*, 2000b; Streb *et al.*, 2003)

La présence de structures tels que les protusions, fréquemment observées chez les plantes alpines, (cf partie 3.1.) permettrait selon (Lütz, 2010, 2013) de réduire les distances entre des chloroplastes et d'autres organites tels que les peroxysomes ou les mitochondries, favorisant ainsi la photorespiration et l'échange de potentiel réducteur avec la valve malade.

La valve malate.

La valve malate est un système fonctionnant grâce à deux enzymes, la NADPH-Malate déshydrogénase (ou NADPH-MDH) et la NAD-malate déshydrogénase (ou NAD-MDH).

La NADPH-MDH, située dans les chloroplastes, permet de catalyser la transformation de l'oxalo-acétate en malate à l'aide de NADPH. L'oxalo-acétate peut être transporté vers les autres organites tels que les mitochondries. Dans ses autres organites, on retrouve la NAD-MDH qui catalyse la réaction inverse à l'aide de NADP⁺. (Fridlyand *et al.*, 1998)

Au cours de la réaction de la NADPH-MDH il y a une consommation de NADPH dans le chloroplaste. De ce fait, la valve malate permet d'équilibrer le ratio NADPH/ATP dans le chloroplaste tout en transférant du pouvoir réducteur d'autres organites de la cellule, notamment la mitochondrie. (Backhausen *et al.*, 1994; Scheibe *et al.*, 2005)

Si l'activité de la NAD-MDH dépend du ratio malate/oxalo-acétate, l'activité de la NADPH-MDH est elle liée à la photosynthèse. En effet, l'activité NADPH-malate déshydrogénase est liée à l'état de réduction de la thioredoxine qui module également l'activité de la Rubisco activase et donc de la Rubisco. (Scheibe, 1991)

Ainsi quand la photosynthèse est ralentie, la chaîne de transport des électrons devient de plus en plus réduite et un excès d'électrons apparaît. Il est postulé que ces électrons en excès pourraient être en partie utilisés pour synthétiser du malate qui, en étant exporté hors du chloroplaste via la valve malate, contribuerait à équilibrer l'état redox du chloroplaste. (Miginiac-Maslow and Lancelin, 2002). Le potentiel redox transféré dans la mitochondrie peut y être utilisé pour la respiration ou par une protéine, Alternative Oxydase (AOx) présente dans la chaîne de transport des électrons pour la respiration.

Cependant, il semble que cette stratégie ne soit pas ou peu utilisée chez les plantes alpines comme mis en évidence par (Streb *et al.*, 2005; Barrero-Sicilia *et al.*, 2017) bien que la valve malate contribue à dissiper l'énergie en excès autour du PSII chez la plante polaire *D. antarctica*. (Perez-Torres *et al.*, 2007)

La réaction de Mehler.

La réaction de Mehler se passe dans le chloroplaste. Elle a été nommée ainsi en hommage au scientifique Alan H. Mehler qui a mis en évidence la production de ROS dans les chloroplastes isolés. (Mehler, 1951)

En réalité, en présence de lumière et sous le coup de l'excitation, il arrive que le PSI soit à l'origine de la production d'ion superoxyde, un ROS très toxique pour les plantes. Ces ions superoxydes sont dans un premier temps detoxifiés sous forme de peroxyde

d'hydrogène sous l'action de la superoxyde dismutase. C'est aussi ce que l'on appelle de cycle eau-eau.

Le peroxyde d'hydrogène ensuite ainsi formé est finalement détoxifié sous forme d'eau grâce à l'ascorbate peroxydase présente dans le chloroplaste.(Nakano and Asada, 1981)

Cette fois alternative qu'est la réaction de Melher permet donc en partie de désengorgé la chaîne de transport des électrons photosynthétique en cas d'exposition à des intensités lumineuses importantes, principalement en contrôlant le stress oxydant ainsi généré au niveau du PSI.

L'implication de ce processus dans la résistance aux stress lumineux est controversée. Chez les plantes terrestres en C3 comme c'est le cas de la majorité des plantes alpines, il semble que ce procédé ne prendrait pas en charge plus de 10% du flux d'électron (Murray *et al.*, 2000). Ce qui en fait un flux alternatif à priori mineur pour les plantes terrestres en général (Ruuska *et al.*, 2000; Driever and Baker, 2011) et en particulier pour les plantes alpines (Laureau *et al.*, 2011). En revanche, il peut être argumenté que du fait que la réaction implique le dioxygène présent dans les chloroplastes, la réaction de Melher pourrait permettre aux plantes de limiter la fixation du dioxygène par la RUBISCO sous réserve que la concentration en CO₂ soit suffisante. (Murray *et al.*, 2000)

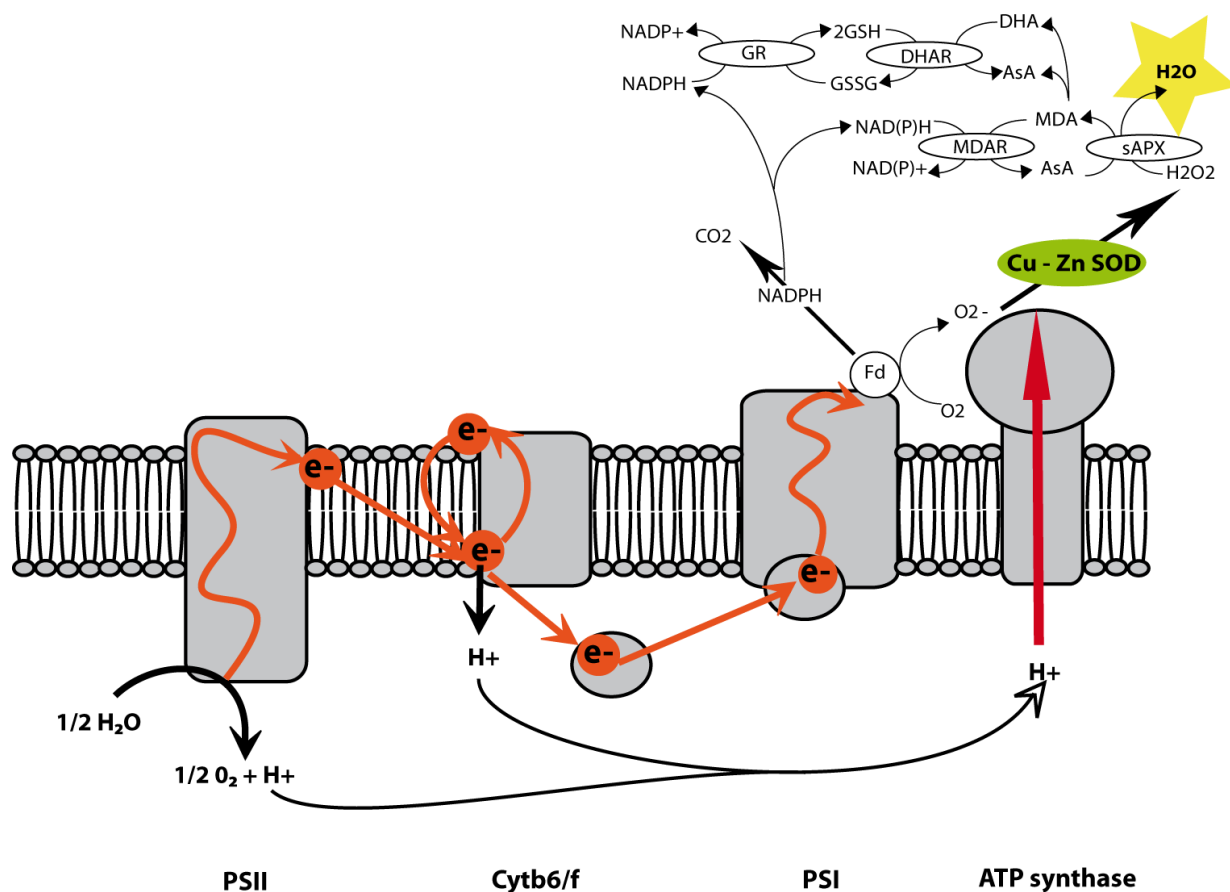


Figure 17: schéma représentatif de l'enchaînement de la réaction de Mehler, d'après (Laureau, 2012)

3. Cadre de l'étude

Cette étude s'inscrit dans la poursuite des recherches menées par Peter Streb, mon directeur de thèse. Au cours de sa carrière, il s'est en effet rapidement passionné pour l'étude de la physiologie des plantes alpines. Il a connu la création du laboratoire de la Station alpine du Col de Lautaret établi dans le but d'offrir aux chercheurs un cadre pour faire de la recherche d'excellence ayant attiré au climat alpin et à l'écologie de ces milieux.

Mon sujet de thèse s'est construit autour des résultats obtenus par Peter Streb au cours de campagne de terrain entre 2014 et 2016 et ceux de Constance Laureau, la précédente thésarde de mon directeur de thèse.

Soldanella alpina étant une plante pérenne, il est nécessaire pour elle de posséder des mécanismes d'acclimatation performants afin de subsister malgré des variations parfois drastiques de ses conditions de vie. En particulier, les nouvelles feuilles qui se sont développées après la fonte des neiges sont progressivement recouvertes par le reste de la végétation composant les prairies alpines. De fait, les feuilles de *S. alpina*

s'acclimatent progressivement à des conditions de faibles luminosités. Hors à l'automne, que ce soit avec le dépérissement des autres espèces végétales ou avec le pâturage, ces feuilles acclimatées à des luminosités faibles se retrouvent confrontées à des luminosités fortes. Ce passage des feuilles à des intensités lumineuses fortes peut, comme vu en partie 3.3.1, être une source de stress oxydant importante. On considérera donc ce passage d'intensité faible à des intensités forte comme un premier événement clef dans le cycle de *Soldanella alpina*.

Les mesures préliminaires obtenues par Peter Streb (figure 21), montraient une augmentation de l'absorbance UV des feuilles de *Soldanella alpina* - mesurées au dualex – lorsqu'on les transférait d'un milieu peu ensoleillé à un milieu à la luminosité plus importante.

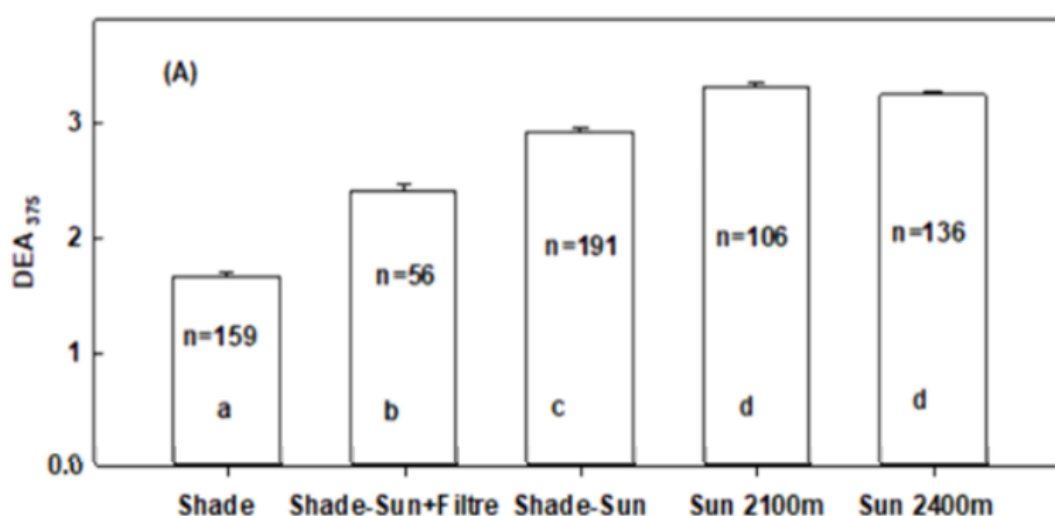


Figure 18: Absorbance UV (DEA 375) des feuilles de *Soldanella alpina* s'étant développées à l'ombre (Shade), transféré de l'ombre à la lumière (Shade-Sun) et ayant poussé à la lumière au Col du Lautaret (Sun 2100m) et du Col du Galibier (Sun 2400m). Le nombre de répliques et les différences significatives entre les différentes conditions sont indiqués sur la figure.

Ces résultats préliminaires nous ont amenés à nous demander par quel mécanisme se faisait cette acclimatation dynamique à la lumière. Pour ce faire, nous avons analysé les changements anatomiques, pigmentaires et les variations de concentration en composés photo-protecteur, notamment les flavonoïdes. Dans le même temps, on s'est posé la question de l'acclimatation de la photosynthèse à de telles variations de luminosité.

La thèse de Constance Laureau s'était intéressée à l'implication de la protéine PTOX dans l'acclimatation des plantes alpines *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina* à des conditions extrêmes. Il en est ressorti que l'activité de la protéine PTOX chez *Ranunculus glacialis* agit comme une valve de sécurité permettant à cette plante alpine de limiter la production de ROS quand le rayonnement lumineux et notamment ultraviolet est trop important (Laureau, 2012; Laureau *et al.*, 2013; Laureau *et al.*, 2015a).

Du fait du rôle de PTOX dans la résistance à de nombreux stress abiotiques, tel que décrits dans la partie 3.4.5, on s'est demandé si cette même activité PTOX avait également un rôle dans la survie de *Soldanella alpina* et *Geum montanum* à la période de fonte des neiges. En effet, ces deux plantes sont pérennes et gardent donc leurs feuilles pendant plus d'une période végétative : elles doivent donc résister aux variations brutales survenant lors de la transition hiver/printemps. Au moment de la fonte des neiges les feuilles de *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, acclimatées à des températures basses et une luminosité nulle, sont soumises à un stress important en passant en l'espace de quelques jours seulement des conditions auxquelles elles étaient acclimatées à des conditions de très forte luminosité couplées à des températures extrêmes. Si un stress lumineux est déjà source d'un stress oxydant important, la combinaison d'un stress lumineux avec un stress thermique est généralement létal pour les plantes. La période de la fonte des neiges constitue en cela une seconde période clef dans les cycles de vie de *Soldanella alpina* et *Geum montanum*.

Comme dit dans la partie 3.3.4, le principal souci en cas de stress est le manque de balance entre le flux électronique total et le flux électronique consommé par les processus photochimiques (Lütz, 2010). Il est ainsi généralement admis que le stress oxydant résulterait d'un excès du flux électronique total au regard de la consommation qui en est faite par la photosynthèse. Dans le cas particulier de la photosynthèse de *Geum montanum* et *Soldanella alpina* au moment de la fonte des glaces on a donc cherché à quantifier ce flux électronique excédentaire et à analyser par quel biais ce flux électronique était dissipé. Notre hypothèse initiale était que si la PTOX jouait un rôle dans la survie de ces plantes alpines au cours de ce second épisode clef de leur cycle de vie alors on pouvait s'attendre à un flux électronique excédentaire important, comme ce le fut pour *Ranunculus glacialis* (Laureau et al., 2013), et corrélé à une forte activité PTOX.

Matériel & méthodes.

1. Sites d'études

1.1. Laboratoire d'Orsay.

Les mesures physiologiques effectuées sur *Thellungiella salsuginea* & *Arabidopsis thaliana* ont été effectuées dans les bâtiments du laboratoire ESE sur le campus d'Orsay de l'université Paris-Sud. La croissance de *Thellungiella salsuginea* & *Arabidopsis thaliana* a également été effectuée dans la serre de culture attenante sur le campus d'Orsay de l'Université Paris-Sud.

1.2. Station alpine Joseph Fourier.

Les mesures physiologiques effectuées sur *Geum montanum* & *Soldanella alpina* ont été effectuées dans le laboratoire de chimie de la Station alpine Joseph Fourier situées à côté du Jardin Alpin du Col du Lautaret, dans les Alpes. *Geum montanum* & *Soldanella alpina* ont été échantillonnées à proximité du Col du Lautaret (45°02'12.2"N 6°24'06.7"E) et du Col du Galibier (45°03'09.9"N 6°24'20.5"E), respectivement à 2100 et 2400 mètres d'altitude.

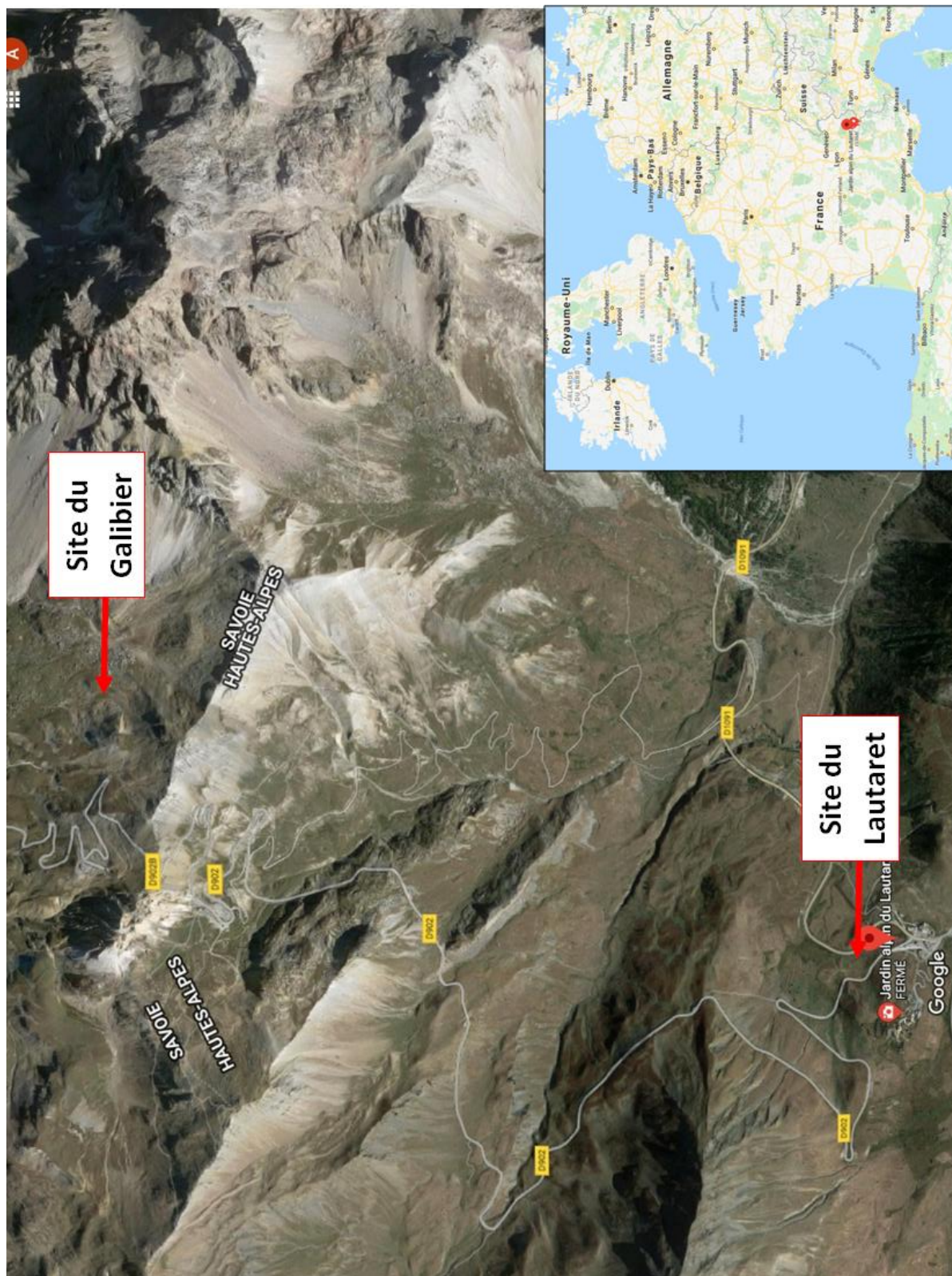


Figure 19: localisation des deux sites d'études du Lautaret et du Galibier dans les Alpes.

2. Matériel végétal, conditions de culture et traitement.

2.1. *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella salsuginea*

2.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana, appelée communément l'Arabette des dames, est une brassicacée que l'on retrouve dans toute la France à des altitudes comprises entre 0 et 1700 m. C'est une plante de pelouse ouverte à thérophytes (plantes annuelles), surtout eutrophile (c'est-à-dire poussant dans des sols riches en nutriments).

Elle a la particularité d'être strictement autogame ce qui permet la formation de lignées uniformes. Elle est également très facile à cultiver, a un cycle de vie court et produit un grand nombre de graines en une génération. La facilité à muter cette plante et sa présence à travers le monde permet d'avoir, à disposition pour les études scientifiques, une grande collection de mutants et un grand nombre de variants naturels (écotype). Son génome de 25498 gènes (125Mb) est de plus entièrement séquencé depuis les années 2000 ce qui en fait un très bon modèle biologique.



Figure 20: Photographie d'une rosette d' *Arabidopsis thaliana* cultivée à Orsay dans la serre (prise en photo par Garance Koch, stagiaire).

2.1.2. *Thellungiella salsuginea*

Thellungiella salsuginea, aussi nommée *Eutrema salsugineum*, est une brassicacée extremophile, capable de croître et de se reproduire dans des environnements où les températures sont très froides (jusqu'à -15°C) ou la salinité importante (jusqu'à 500mM de NaCl). (Inan *et al.*, 2004).

Tout comme *Arabidopsis thaliana*, elle possède un petit génome (250Mb), pousse aisément en laboratoire, a un cycle de vie court, est capable de générer un grand nombre de graines en une génération et peut être facilement muté. La grande similarité de son génome avec celui d'*Arabidopsis thaliana* (92% de similarité en moyenne, (Inan *et al.*, 2004)) en a fait un modèle de choix pour l'étude comparée des résistances aux stress abiotiques (Amtmann, 2009) , notamment aux stress salin et plus récemment stress thermique. (Griffith *et al.*, 2007)



Figure 21: Photographie d'une plante de *Thellungiella salsuginea* cultivée dans la serre de l'université d'Orsay (prise par Garance Koch, stagiaire)

2.1.3. Conditions de culture et traitements de *T.salsuginea* et *A.thaliana*

Les semences de *Thellungiella salsuginea* (écotype Shandong WT) et d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia WT) sont vernalisées à 4°C pendant au moins 5 jours puis mises à germer dans du terreau, en conditions contrôles avec des températures jour/nuit d'environ 23°C/18°C, une photopériode de 8h et une densité de flux de photons de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les valeurs de température de l'air et l'intensité lumineuse au niveau des plantes sont enregistrées toutes les 30 secondes pendant 3 semaines avec un Campbell data logger (CR23X ; Campbell Scientific Inc., Utah, UT, USA) comme décrit dans (Laureau, Bligny et al. 2011). Au bout de trois semaines, les plantules ayant émergées sont transférées dans du terreau dans des pots de 5,5cm de diamètre afin de poursuivre leur croissance. Pendant la croissance, les plantes sont régulièrement arrosées avec de l'eau déionisée.

Huit semaines après semi, les plantes ont alors atteint un stade de maturité acceptable (que l'on considère ici être le début de la sénescence des premières feuilles formées) pour être soumises à un stress et une taille suffisante pour que l'on puisse effectuer les mesures. On les arrose avec une solution de 150 mM de NaCl (traitement au NaCl) ou de l'eau déionisée (contrôle) pendant 7 jours. Les mesures sont effectuées sur les plus grandes feuilles (les plus jeunes feuilles matures) à l'issue des 7 jours de traitement.

2.2. *Geum montanum*

2.2.1. Botanique

Geum montanum est une rosacée. Familièrement nommée la « Benoite des montagnes », elle possède une corolle d'un jaune lumineux composée de 6 pétales. (Abbé Coste, 1937)

2.2.2. Ecologie

Geum montanum est une plante vivace commune à la flore orophile centre et sud européenne. On la retrouve donc notamment en France dans le Jura, les Alpes, les Pyrénées, la Corse et la région Auvergne. (Jean-Marc Tison, 2014)

C'est une espèce calcifuge et acidiphile qui a besoin pour se développer d'une couverture neigeuse en hiver. *Geum montanum* pousse essentiellement sur les gazons alpins où il y a suffisamment d'humus. (Faverger and Robert, 1995)

On la retrouve à des altitudes comprises entre 1200 et 2800 m (Jean-Marc Tison, 2014) et fleuri de juillet à août. (Julve, 2019)



Figure 22: Photographie d'une plante de *Geum montanum* en fleur, Fondation Saxifrage, Willem van Kruijsbergen, freenatureimages.eu.

2.3. *Soldanella alpina*

2.3.1. Botanique

Soldanella alpina, plus connue sous le nom de « Soldanelle alpine », est une primulacée. (Abbé Coste, 1937)

2.3.2. Ecologie

Soldanella alpina est une plante vivace elle aussi commune à la flore orophile centre et sud européenne. On la retrouve dans le Jura, les Alpes, les Pyrénées et la région Auvergne (Jean-Marc Tison, 2014) à des altitudes comprises entre 1200 et 2800m. (Laureau *et al.*, 2015b)

C'est une plante de pelouse alpine climacique, c'est-à-dire qu'on la retrouve dans les zones ayant atteints un équilibre écologique. Elle est calcicole (Crawford, 2008), chinophile et basiphile (Jean-Marc Tison, 2014) et s'adapte à différents types de sols mais tolère mal le manque de lumière. Sur nos sites d'études, on retrouve majoritairement *Soldanella alpina* sur les pelouses rocailleuses et les éboulis. (Faverger and Robert, 1995)

Elle est remarquable par sa capacité de traverser, pour fleurir, une certaine épaisseur de neige. Et ses feuilles sont capable de survivre pendant au moins deux périodes végétatives. (Laureau *et al.*, 2015b)



Figure 23: photographie d'un plant de *Soldanella alpina* en fleur , , Fondation Saxifrage, Willem van Kruijsbergen, freenatureimages.eu.

2.4. Conditions de culture et traitements de *Geum montanum* & *Soldanella alpina*.

Geum montanum & *Soldanella alpina* sont deux plantes alpines que l'on retrouve conjointement dans la zone de travail définie en 1.2. Certaines mesures sont effectuées directement sur le terrain : c'est le cas des mesures au mini PAM et au Dualex. Pour le reste des mesures, les terrains étant escarpés et les appareils de mesure n'étant pas facilement déplaçables, c'est les plantes qui ont été déplacés du site d'étude au laboratoire de la station alpine Joseph Fourier où les mesures étaient effectuées. Pour ce

faire, des blocs de terre contenant les plantes d'intérêt ont été excavés à l'aide d'un marteau et d'un burin et transportés dans des pots. Une attention particulière est portée au cours de l'excavation à ce que le bloc prélevé soit de taille suffisante pour que les racines soient les moins abimées possible. Le temps de l'expérience, les plantes excavées sont régulièrement arrosées, conservées au soleil (pour les plantes à feuilles jeunes ou vieilles) ou sous la glace et maintenu à basses températures (pour les plantes prélevées sous la neige).

Les conditions de culture ne sont pas contrôlées, les plantes poussant en milieu naturel sans interventions humaine. Des mesures des paramètres environnementaux tels que les valeurs de températures de l'air et le PFD au niveau de certaines des plantes étudiées sont néanmoins enregistrées toutes les 30 secondes pendant l'intégralité de la période d'étude avec un Campbell data logger (CR23X ; Campbell Scientific Inc., Utah, UT, USA) comme décrit dans (Laureau, Bligny et al. 2011). L'intensité des rayonnements UV est également mesurée.

Les plantes étudiées sont les plantes sous la neige (étudiées tant que la neige était encore naturellement présente sur le terrain), les plantes ayant de jeunes feuilles (au début de la saison c'est-à-dire vers la fin juillet) et celles ayant de vieilles feuilles (étudiées après dégel), différentiable morphologiquement ou alors ayant été marquées.

On veut également travailler sur les jeunes feuilles formées à forte et à faible lumière. Pour distinguer les feuilles formées à forte lumière de celles formées à faible lumière, sous le couvert des autres espèces végétales composant la prairie alpine, on utilise un dualox flavonoïde (Force A, France) tel que décrit plus tard dans la partie 5.2. Certaines des plantes poussant à l'obscurité sont transférées à la lumière en coupant la végétation alentour. Les plantes ayant poussées à faible et forte lumière et celles transférées sont marquées. Les premières mesures sont faites au début du mois de Juillet et l'évolution de plusieurs paramètres sont suivis sur les 30 jours suivant.

Pour cette partie des expériences, un arrosage a été nécessaire en 2016 et 2017 afin de pallier à des températures particulièrement importantes et une sécheresse risquant de provoquer une mortalité importante des plantes sur lesquelles l'expérience était menée.

3. Récapitulatif des principales mesures effectuées et des limites rencontrées au cours de cette thèse.

Cette thèse étant centrée sur la physiologie des plantes alpines, la quasi-totalité des mesures ont été effectuées sur *Soldanella alpina* et *Geum montanum*. Nos principaux buts étant de plus de comprendre les mécanismes d'acclimations de ces deux plantes, en réaction à la fonte des neiges et d'un transfert de l'ombre à la lumière, il était nécessaire de faire les expériences à la fois au plus vite et au plus près pour éviter que les plantes se désacclimatent.

Quand il était possible, les mesures ont donc été faites *in situ*. Pour les mesures qui demandaient des équipements ou un traitement spécifiques, un monitoring par le biais d'un ordinateur ou une précision importante, soit les feuilles ont été récupérées sur le terrain et immédiatement préservées dans de l'azote liquide puis dans un congélateur à -80°C, soit les plantes étaient excavées (tel qu'expliqué partie 2.2.).

Une première limite a donc été matérielle. Si le laboratoire de la SAJF est globalement bien équipé, il y manquait néanmoins des équipements nécessaires pour l'obtention des résultats souhaités.

Sur place, nous avons ainsi pu utiliser le Li-Cor 6400 équipé de son fluorimètre (Inc., Lincoln, NE, USA) ainsi que le spectroscope (pour les dosages et les cinétiques enzymatiques). Les Dualex (Force A, Orsay, France), gracieusement fourni par l'équipe de Zoran Cerovic, et les mini-Pam (Walz, Effeltrich, Allemagne) utilisées sur le terrain étaient apportés d'Orsay. Les spectres de fluorescence chlorophyllienne à 77K et les mesures Caméra (pour l'examen de la vitesse de ré-oxydation du pool de quinone) ont été faits à l'aide du matériel gracieusement prêté par l'équipe de Giovanni Finazzi (CNRS Grenoble). Il apparaît important ici de noter que due à la nature du site, l'approvisionnement en consommables nécessaires aux expériences avec le Li-Cor 6400 (Inc., Lincoln, NE, USA), notamment l'azote, est particulièrement difficile. Cela a été à l'origine de limitations qui expliquent le peu de résultats obtenue pour certaines conditions.

Les mesures avec la sphère d'intégration ont été faites à Orsay sur des plantes excavées puis transporté vers la région parisienne dans un délai maximum de 72h après prélèvement. Le matériel nécessaire à ces mesures ne pouvait pas être emporté sur mes sites d'études du fait d'une utilisation de ce même matériel par des équipes travaillant en Guyane.

Les analyses anatomiques nécessitant un microscope à épifluorescence ont été déléguées à Sylvie Meyer, travaillant sur la plateforme ImagoSeine à Paris, spécialisée dans ce genre d'expérience. Les analyses HPLC, nécessitant là aussi une expertise et du matériel spécifique présent ni à la SAJF, ni sur le campus d'Orsay, ont été déléguées à Luc Bidet travaillant à l'Université de Montpellier. Les plantes étaient alors excavées, transporté respectivement vers la région Parisienne ou Montpellier, et analysées dans un délai de 72h maximum après le prélèvement.

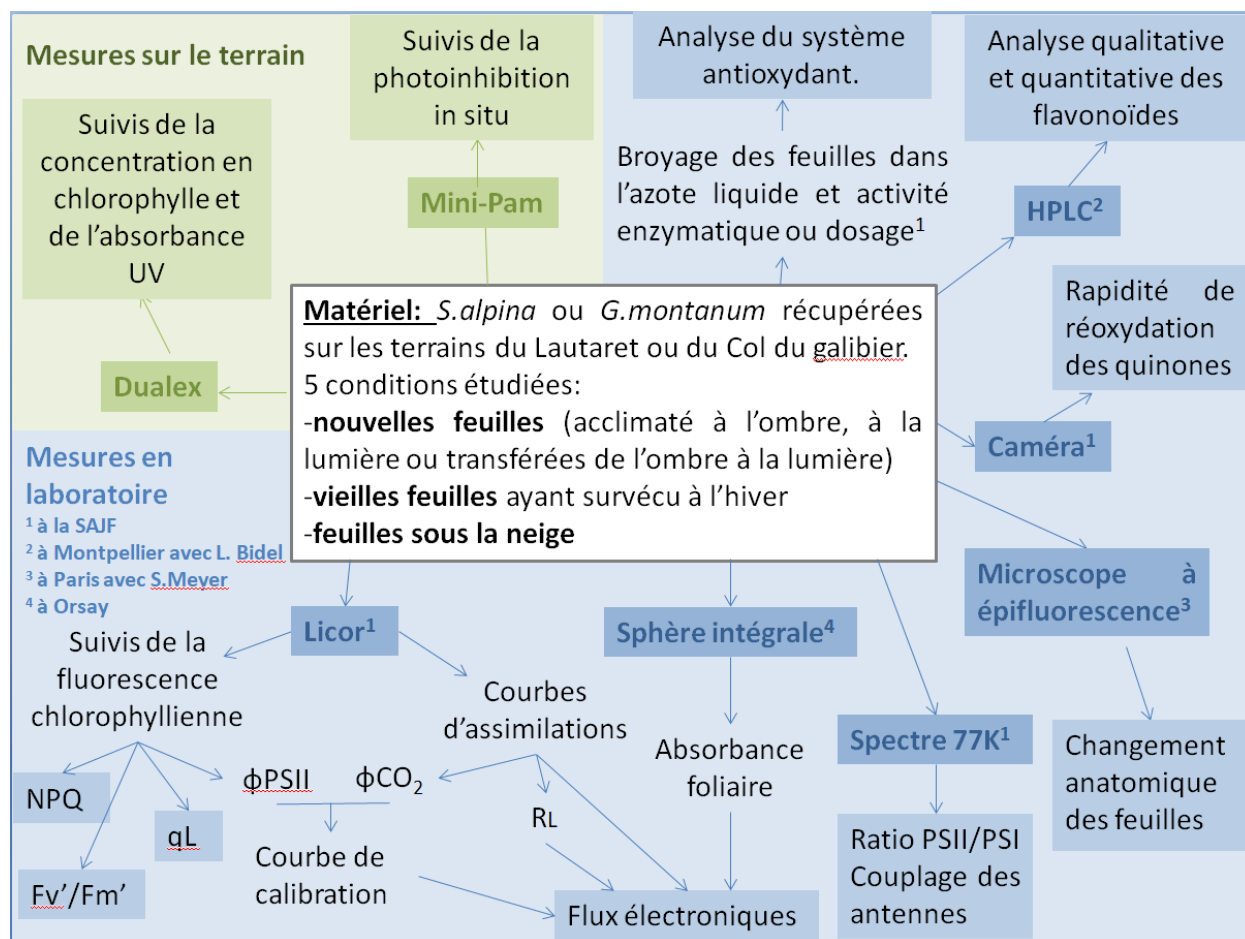


Figure 24: Schéma récapitulatif des différentes expériences conduites au cours de cette thèse. Sont spécifiés ici les machines utilisées, l'information recherchée à travers l'utilisation de celles-ci et le site sur lequel sont faites les mesures.

Une seconde limite pour l'obtention des résultats a été une contrainte de temps. En effet, il s'agissait principalement d'étudier les plantes à une phase clef de leur développement : la fonte des neiges, qui s'étend de mi-mai à juin dans les Alpes (aux altitudes auxquelles on travaillait). Les expériences sur les vieilles feuilles et les feuilles sous la neige se sont donc fait de fin mai à juin. Les expériences sur les feuilles nouvellement formées, acclimatés à l'ombre, la lumière ou transférées, se sont faites en juillet. La période sur laquelle les résultats et les échantillons pouvaient être récupérés était donc très courte et ne pouvait être étendue pour des raisons de budget et de sécurité.

Enfin, une dernière limite est due aux différents aléas rencontrés au cours de cette thèse. Mon projet de thèse comprenait trois campagnes de terrains : la première de fin mai à fin juillet 2017, la seconde de fin mai à fin juillet 2018 et la dernière de fin juin à mi-juillet 2019. Il me paraît important de présenter ici quelques uns des aléas ayant eu des impacts notables sur mon travail. Tout d'abord, la première campagne de terrain n'a pas pu être menée à bien du à un souci de santé qui m'a conduit à être hospitalisé

courant juin et arrêtée pendant plus d'un mois. Lors de la seconde campagne de terrain, un mauvais branchement de la caméra utilisée pour l'étude de la vitesse de ré-oxydation du pool de quinone et un pâturage inattendu de nos sites d'études nous ont empêchés d'obtenir les résultats souhaités à l'issue de cette campagne de terrain. Enfin, la dernière campagne de terrain, au cours de laquelle il n'y a pas eu de soucis majeurs, n'a pas permis de rattraper en totalité le travail initialement prévu au cours de mes trois années de thèses.

Les limites matérielles, les soucis de temps et les aléas survenus lors des campagnes de terrains sont responsables du faible nombre de réplicas obtenu pour certaines expériences.

4. Mesure en laboratoire des paramètres photosynthétiques d'échanges gazeux et de fluorescence.

L'assimilation nette du CO_2 (A_N) par les feuilles et la fluorescence chlorophyllienne sont mesurées à l'aide d'un Li-Cor 6400 (Inc., Lincoln, NE, USA) équipé d'un fluorimètre 6400-40 (Priault *et al.*, 2006). Le système est placé dans une enceinte close en plexiglace (figure 19) raccordé à un système de régulation thermique permettant de limiter les variations de CO_2 et de températures dans la chambre de mesure. Pour la mesure, un plastique est ajouté au niveau de la plante mesurée et de la tête de l'appareil pour réduire encore d'avantage les variations de CO_2 .

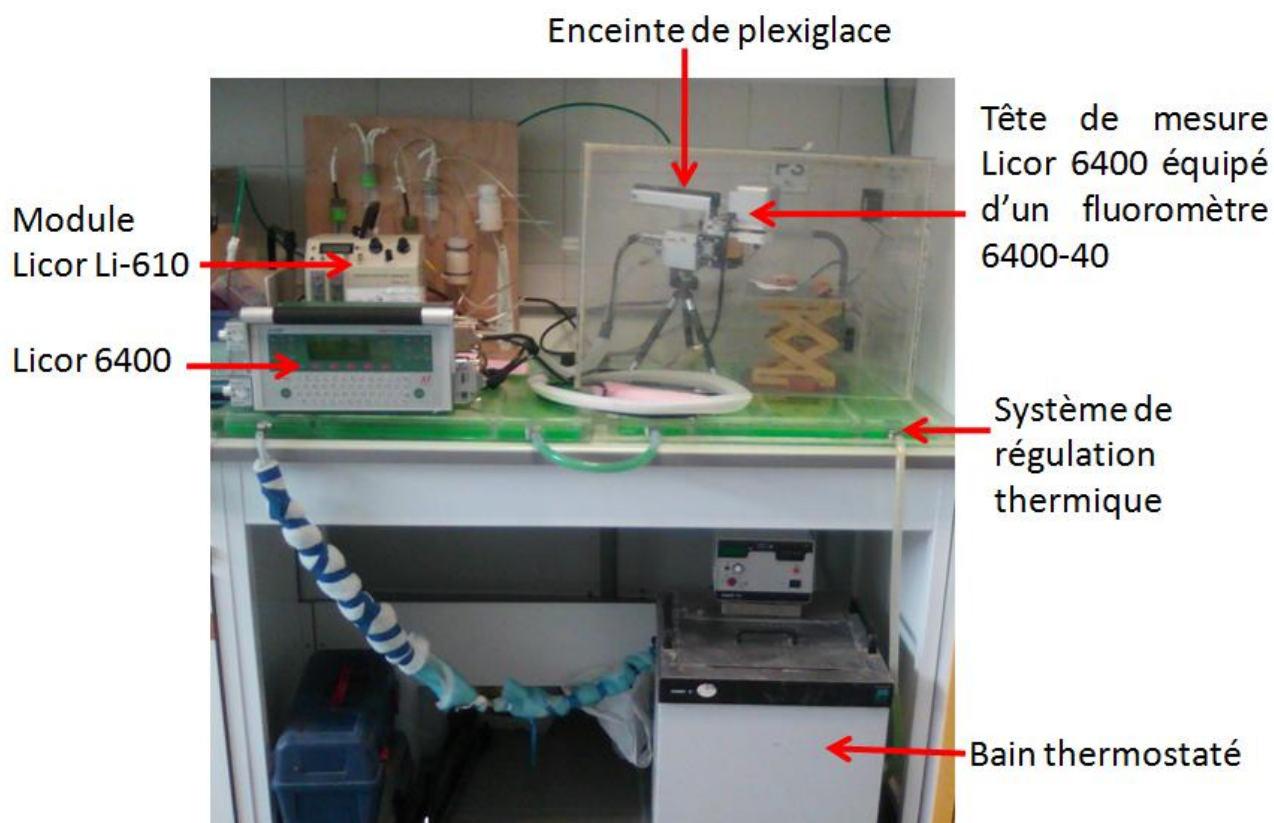


Figure 25: Photographie du dispositif de mesure. La tête de mesure du Licor 6400 équipé du fluoromètre est placée dans une enceinte plexiglas sur un système de régulation thermique dont la température est modulée par un bain thermostaté. Le module Licor 6400 permet le contrôle des paramètres de mesure et l'enregistrement des données. Le module Licor Li-610 permet lui de moduler l'humidité à l'intérieur de la tête de mesure.

Les mesures se font *in vivo* sur les feuilles, maintenues à 25°C tout au long de l'expérience. Le protocole suivi est basé sur les suggestions formulées par (Johnson and Murchie, 2011).

L'humidité de l'air est contrôlée à l'aide d'un module Licor Li-610 qui permet d'ajuster l'humidité de l'air en fonction du point de rosée.

F_0 et F_m sont ainsi déterminés après 30 minutes d'acclimatation à l'obscurité dans une atmosphère « normale » de 21% O_2 et 400ppm CO_2 (Ca). Les mesures d'assimilation nette du carbone pendant cette période permettent de déterminer la respiration à l'obscurité. Les feuilles mesurées sont par la suite acclimatées à un PPFD de 400 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *Thellungiella salsuginea* et *Arabidopsis thaliana* et un PPFD de 750 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *Geum montanum* et *Soldanella alpina* (toujours dans une atmosphère normale) pendant 20 à 30 minutes, jusqu'à stabilisation de l'assimilation nette du carbone (A_N) et de la conductance stomatique. Pour le reste de l'expérience, l'émission de fluorescence à la lumière est mesurée toutes les 4 à 6 minutes sous lumière actinique (F_t), au cours d'un flash de lumière saturante (1.2s) (F'_m) suivis d'une courte

période d'obscurité et d'une exposition en rouge lointain (F'_0). Nous avons ensuite déterminé les courbes réponses à la lumière et au CO_2 , dans des atmosphères contenant 21% puis 0,5% de dioxygène, en effectuant des mesures de l'assimilation nette avec respectivement une gamme d'intensités lumineuses variant de 50 à 2000 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans 400ppm CO_2 et des fractions molaire de CO_2 (Ca) comprises entre 50 et 2000 $\mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$ à 400 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *Thellungiella salsuginea* et *Arabidopsis thaliana* et une intensité lumineuse de 750 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *Geum montanum* et *Soldanella alpina*. Dans chaque cas, on commence avec les intensités lumineuses ou les pressions partielles de CO_2 utilisées lors de l'acclimatation de la plante et ont fait ainsi une première série de mesures avec des intensités ou pressions partielles décroissantes puis ont ré-acclimaté aux conditions choisies pour l'acclimatation à la lumière les plantes avant de faire la deuxième partie des mesures cette fois avec des intensités ou des pressions partielles croissantes.

5. Calculs basés sur les mesures d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne.

5.1. Recalcul des paramètres de fluorescence

Les mesures de fluorescence reposent sur le principe simple selon lequel l'énergie lumineuse récoltée par les antennes ne peut être dissipée que de trois façons :

- 1) utilisation photochimique par le biais d'une génération d'électrons consommés par la photosynthèse, la photorespiration ou les flux alternatifs
- 2) dégagement de chaleur
- 3) production d'une fluorescence chlorophyllienne.

Ces trois modes de dissipations étant en compétition, on peut, en mesurant simplement la fluorescence chlorophyllienne, avoir des informations sur les autres paramètres (Maxwell and Johnson, 2000).

L'utilisation de l'énergie lumineuse sous forme de lumière est mesurée dans notre expérience grâce au monitoring de la concentration en CO_2 par le LICOR mais d'autres paramètres relatifs à l'utilisation photochimique de la lumière peuvent être calculés grâce à la fluorescence tels que le rendement quantique du PSII (équation 1) et, si on a préalablement procédé à une acclimatation à l'obscurité, le rendement quantique maximum du PSII (équation 2) et le rendement quantique du PSII (Baker, 2008).

$$\phi_{PSII} = \frac{(F_{m'} - F')}{F_{m'}} \quad (1)$$

$$F_v/F_m = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} \text{ et } F_v'/F_{m'} = \frac{(F_{m'} - F_0')}{F_{m'}} \quad (2)$$

Le dégagement de chaleur lui peut être facilement estimé par le calcul du Non Photochemical Quenching (NPQ) à partir de paramètres de fluorescence (équation 3) tel que définis par (Bilger and Björkman, 1990).

$$NPQ = \left(\frac{F_m - F_{m'}}{F_{m'}} \right) \quad (3)$$

On considère que le photosystème II (PSII) est ouvert quand la quinone associée, Q_A , est oxydée et capable d'accepter des électrons. Lorsque la quinone A est réduite, les électrons sont bloqués et le PSII reste alors excité : on dit que le centre réactionnel du PSII est fermé. L'acclimatation à l'obscurité permet l'ouverture de tous les centres réactionnels. (Baker, 2008) La fluorescence après l'adaptation à l'obscurité, fonction du taux de Q_A oxydées, nous donne donc la valeur maximale de PSII potentiellement ouverts. La valeur q_L que l'on peut calculer par la suite à l'aide de l'équation (équation 4), représente la fraction de PSII ouverts. Plus q_L est proche de 1, moins il y a d'électrons qui restent au niveau du PSII et donc plus la chaîne de transfert des électrons photosynthétiques est réduite.

$$q_L = \left(\frac{F_m - F'}{F_{v'}} \right) \times \frac{F_0'}{F'} \quad (4)$$

5.2. Estimation du flux d'électron photorespiratoire et du flux alternatif d'électrons.

En parallèle des courbes d'assimilation du CO_2 et des courbes assimilations en fonction de l'intensité lumineuse, on détermine et/ou on recalcule plusieurs paramètres permettant *in fine* le calcul des flux électroniques au niveau de la chaîne de transfert des électrons avec autant de précision que possible.

5.2.1. Respiration à la lumière.

La respiration à la lumière (R_L) est généralement à hauteur d'environ 50% de la respiration à l'obscurité mais cela peut varier d'une plante à l'autre (Villar *et al.*, 1994).

Elle a donc été estimée sur nos plantes par la méthode de (Laisk, 1977) comme décrit par (Priault *et al.*, 2006) puis la méthode de (Walker and Ort, 2015), plus précise.

Des courbes A_N/C_i ont été faites à cinq intensités lumineuses différentes (50, 100, 200, 400 et 600 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pour des teneurs en CO_2 faibles (comprises entre 50 et 120 $\mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$).

Comme on peut le voir sur l'exemple donnée en figure 23, les courbes de l'assimilation en fonction de la concentration de CO_2 dans la feuille aux différentes intensités lumineuses se croisent en un point définis comme étant le point de compensation du CO_2 intercellulaire, C^* (Brooks and Farquhar, 1985). D'après (Laik, 1977), l'abscisse de ce point C^* correspond à δ^* , concentration de CO_2 pour laquelle la photosynthèse et la respiration se compensent et l'ordonnée correspond à la respiration à la lumière, R_L .

Les ordonnées à l'origine des différentes droites A_N/C_i pour les différentes intensités lumineuses peuvent ensuite être représenté en fonction des pentes associés (figure 24) selon la méthode de (Walker and Ort, 2015) qui permettra de retrouver grâce à l'équation de régression de la droite, R_L comme étant l'ordonné à l'origine et δ^* , la pente.

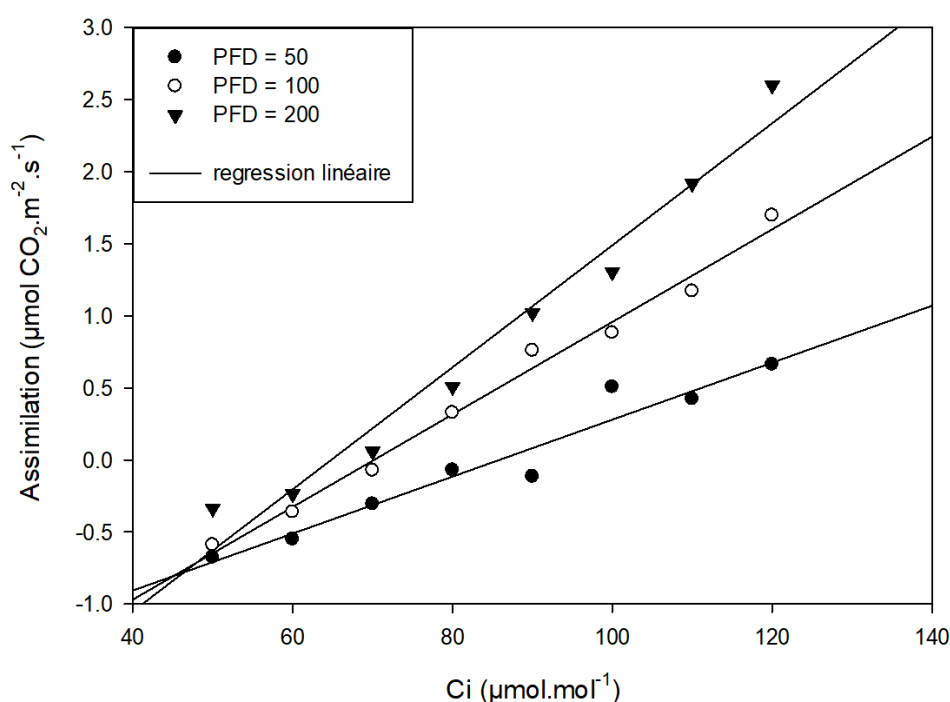


Figure 26: courbes d'assimilation en fonction de la pression partielle en CO_2 (C_i) à différentes intensités lumineuses (PFD = 50 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, PFD = 100 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et PFD = 200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) permettant le calcul de la respiration à la lumière d'un plant de *Geum montanum* d'après (Laik, 1977)

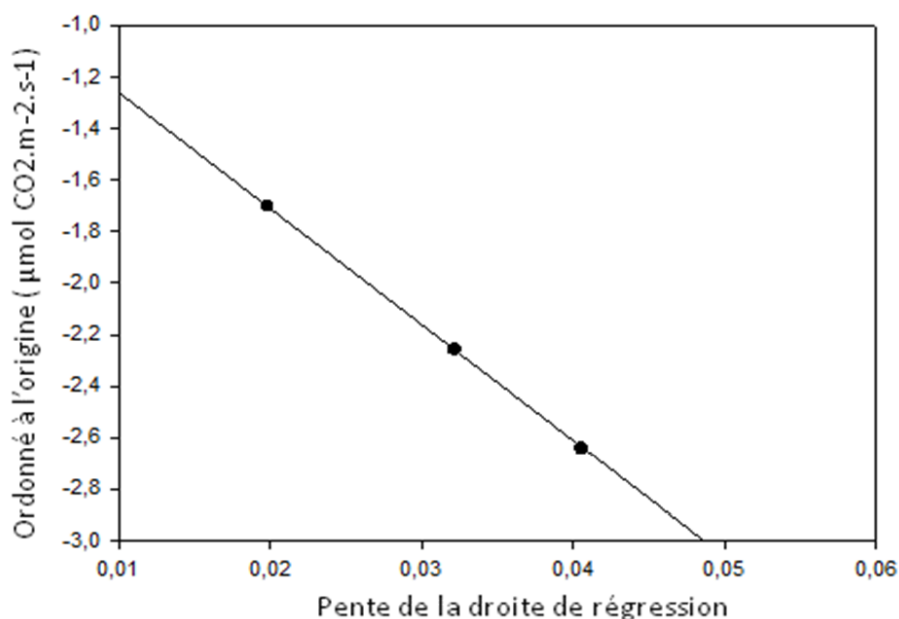


Figure 27: Exemple de l'application de la méthode de (Walker and Ort, 2015), utilisant les résultats de la figure 26 et permettant le calcul de la respiration à la lumière pour un plant de *Geum montanum* d'après (Laisk, 1977)

5.2.2. Mesure de l'absorption foliaire.

Dans le même temps, l'absorbance des feuilles est mesurée sur les feuilles de plantes âgées de 10 semaines pour *Arabidopsis thaliana* et sur les feuilles matures des plants de *Geum montanum* et *Soldanella alpina* ramenées au laboratoire de l'université d'Orsay et conservées en chambre froide après prélèvement en juillet sur le site du Lautaret tel que décrit dans le paragraphe 2.2. La mesure pour *Geum montanum* et *Soldanella alpina* s'effectue au plus tard une semaine après prélèvement.

La mesure se fait à l'aide d'une sphère d'intégration selon la méthode décrite par (Noda *et al.*, 2013)

La sphère d'intégration est une sphère de métal disposant de 4 ports et dont l'intérieur est recouvert d'une couche de sulfate de baryum. Un de ses ports est muni d'un porte échantillon permettant de maintenir la feuille pendant la mesure (port S). Un deuxième dispose d'un embout permettant la fixation d'une fibre optique reliée à un spectrophotomètre et qui permet de faire la mesure (port M). La sphère d'intégration dispose pour finir d'un puits à lumière (noir) et d'un standard, recouvert d'une couche de sulfate de baryum.

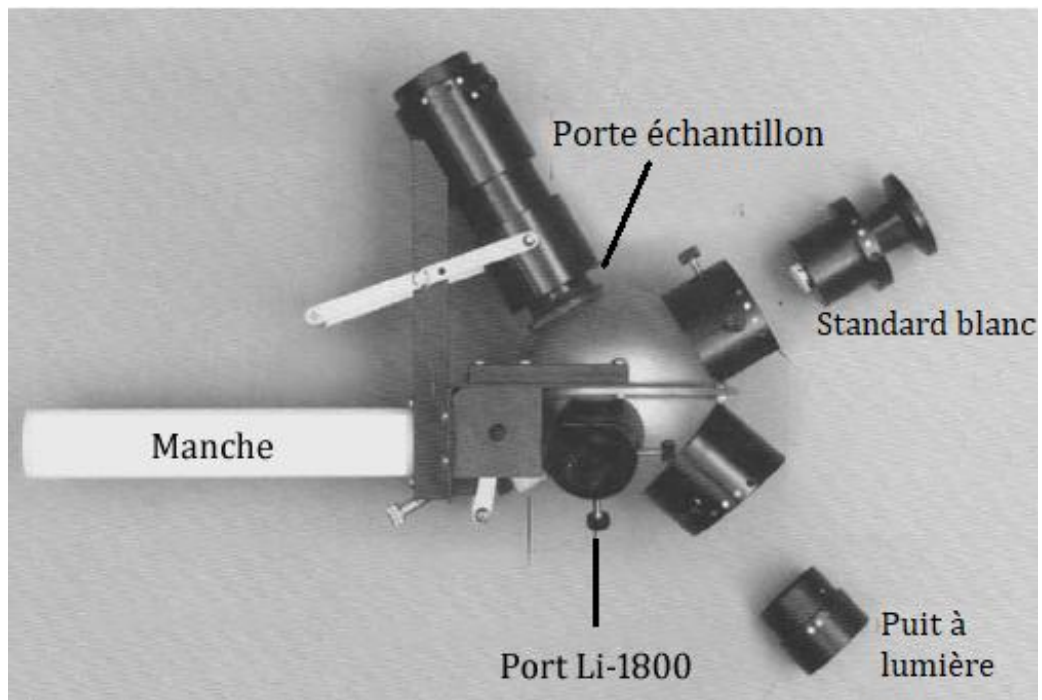
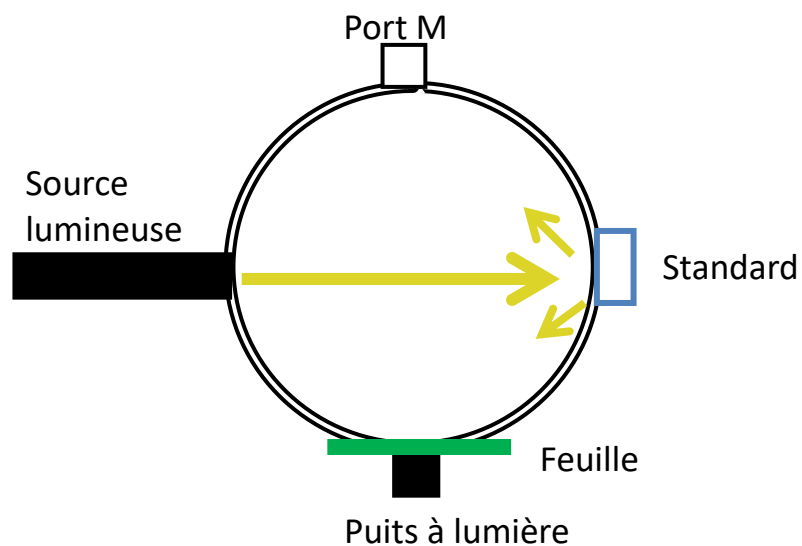


Figure 28: Photographie de la sphère d'intégration utilisée pour la mesure de l'absorption foliaire. Elle dispose de 4 ports permettant de mesurer la transmittance et la réflectance grâce au revêtement intérieur en sulfate de baryum.

Le sulfate de baryum est un composé blanc ayant un indice de réflexion élevé qui va donc permettre à la lumière de se diffuser de façon homogène dans la sphère.

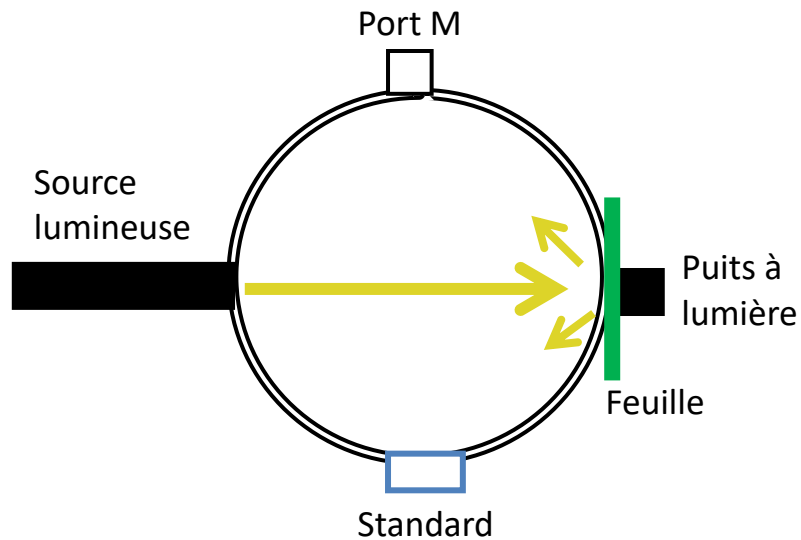
Pour mesurer, il est nécessaire de faire 3 mesures :

-une mesure de référence avec la sphère intégrative configurée comme ci dessous.



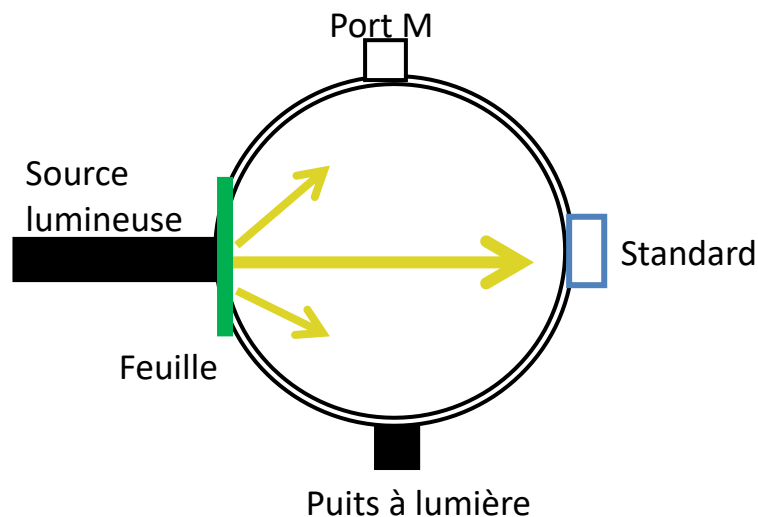
Dans cette disposition, la lumière produite par la source lumineuse est directement réfléchiée par le standard et diffusée dans la sphère. Elle permet d'avoir un spectre de référence caractéristique de la sphère et de la lumière utilisée qui va servir d'étalon, S.

- une mesure de reflectance avec la sphère intégrative configurée comme ci dessous.



Dans cette disposition, la lumière produite par la source lumineuse est cette fois réfléchiée par la feuille. Toute la lumière qui pourrait traverser la feuille est piégée dans le puits à lumière placé derrière l'échantillon. Dans la sphère est ainsi diffusée uniquement la lumière réfléchiée par la feuille ce qui permet d'obtenir le spectre de reflectance, R.

- une mesure de transmittance avec la sphère intégrative configurée comme ci dessous.



Dans cette disposition, la source lumineuse est placée derrière l'échantillon. La lumière produite par la source lumineuse passe donc à travers la feuille. Toute la lumière qui pourrait être réfléchiée par la feuille est renvoyée vers la source et dans la sphère est ainsi diffusée uniquement la lumière transmise par la feuille ce qui permet d'obtenir le spectre de transmittance, T.

Comme le spectre de référence correspond à la totalité de la lumière projetée dans la sphère à chaque longueur d'onde. Il suffit pour connaître la quantité de lumière absorbée par la feuille, de retrancher à ce spectre de référence, la proportion de lumière réfléchiée par la feuille (à savoir la réflectance) ainsi que la proportion de lumière transmise par la feuille (à savoir la transmittance).

Soit si l'on nomme A, l'absorbance de la feuille :

$$A = 1 - \frac{R}{S} - \frac{T}{S}$$

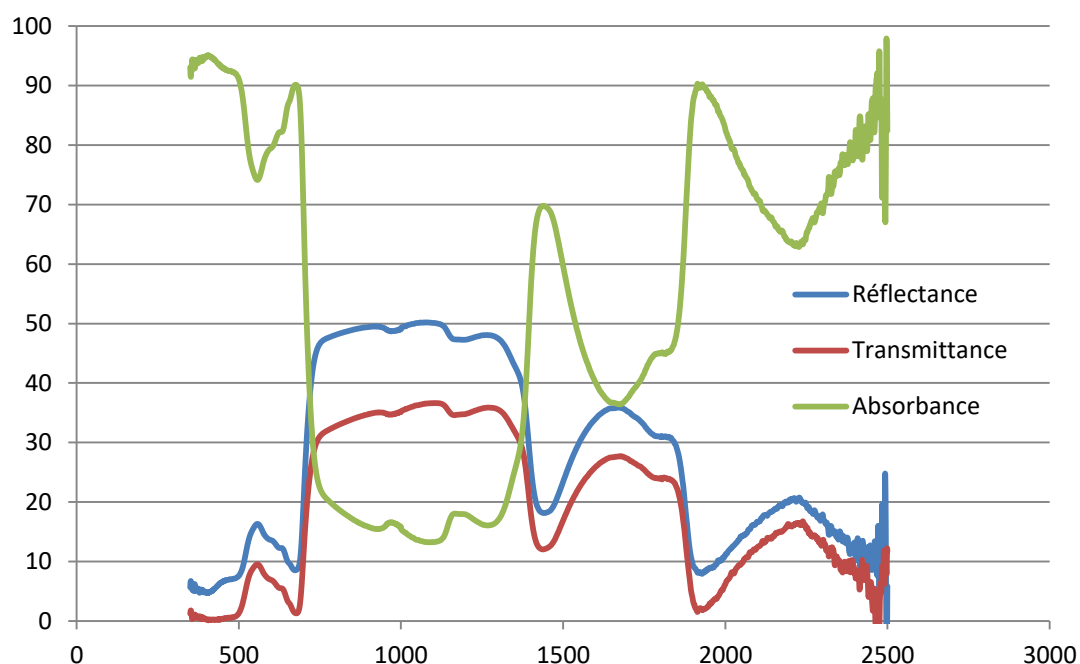


Figure 29: spectres de réflectance, transmittance et absorbance d'une feuille de *Geum montanum*.

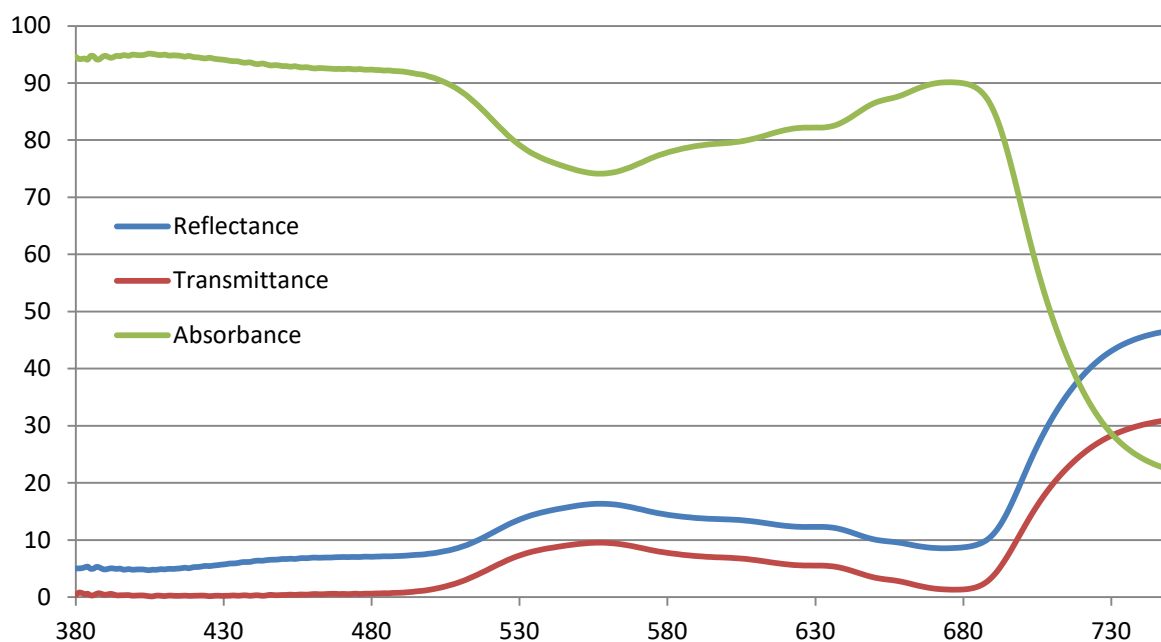


Figure 30: détail des spectres de reflectance, transmittance et absorbance d'une feuille de *Geum montanum* dans le visible (380nm-750nm)

5.2.3. Calibration du rendement quantique du CO_2

Le LICOR donne une mesure du flux électronique total au niveau du PSII (ETR) dont le calcul est programmé dans l'appareil.

Il existe deux façons de calculer le flux électronique total au niveau du PSII :

$$ETR = \phi_{PSII} \times 0,5 \times Absorption\ foliaire \times PFD \quad (5)$$

(Genty *et al.*, 1989)

Ou sous le postulat que 4 électrons sont nécessaires pour la fixation d'une molécule de CO_2 ou d' O_2 .

$$ETR = \phi_{CO_2} \times 4 \times Absorption\ foliaire \times PFD \quad (6)$$

Le rendement quantique du photosystème II (ϕ_{PSII}) est un paramètre calculé, comme on a pu le voir partie 4.1, grâce à la fluorescence chlorophyllienne. Or sur des feuilles relativement épaisses comme c'est le cas pour les plantes alpines, la fluorescence n'est mesurée que sur les premières couches cellulaires de la face supérieure de la feuille (figure 28) et on a des phénomènes de réabsorption qui résultent en une sous-estimation de la fluorescence chlorophyllienne (Govindjee and Papageorgiou, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2017).

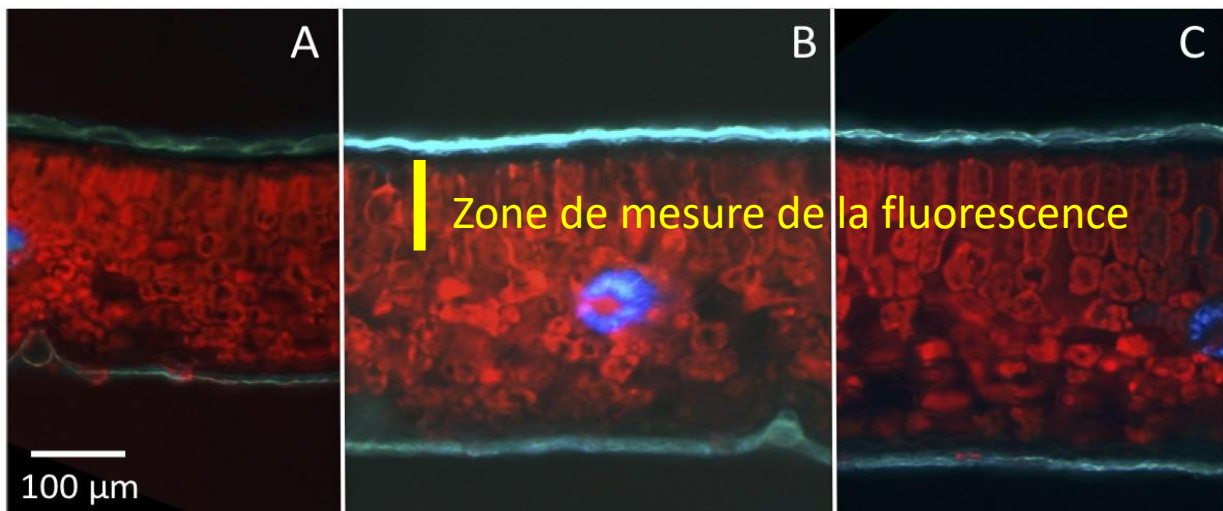


Figure 31: vue au microscope d'une coupe transversale de feuille de *Soldanella alpina*, le rouge correspond à la fluorescence chlorophyllienne. En jaune est figurée la zone de mesure de la fluorescence. (Imagoseine)

De ce fait le recalcule du transfert électronique total au niveau du photosystème II à l'aide du rendement quantique de ce dernier est imprécis car non représentatif de l'intégralité de la feuille étudiée.

De même le recalcule du transfert électronique total au niveau du photosystème II à l'aide du rendement quantique du CO_2 sera imprécis car le calcul du rendement quantique du CO_2 est basé sur les variations de CO_2 mesurées dans la chambre de mesure par le LICOR. Or ses variations de CO_2 ne correspondent pas seulement à la quantité de CO_2 fixée par la photosynthèse mais prend aussi en compte le CO_2 dégagé par le biais de la photorespiration et de la respiration par la portion de feuille mesurée. Ainsi le rendement quantique du CO_2 tel que fourni par le LICOR est en réalité sous-estimée si la mesure est faite sous atmosphère normale. (Cornic and Briantais, 1991; Cornic and Ghashghaie, 1991)

Une façon d'avoir un rendement du CO_2 correct est de travailler dans une atmosphère dépourvue de dioxygène. Dans ses conditions, la photorespiration sera nulle car il n'y a pas de compétition au niveau de la RUBISCO entre fixation du CO_2 et consommation de O_2 . (Cornic and Briantais, 1991; Cornic and Ghashghaie, 1991)

Le ϕCO_2 des échantillons dans une atmosphère 0,5% de O_2 est tout d'abord recalculé selon l'équation 7 afin de tenir compte de la respiration à la lumière telle que estimée en 4.2.1.

$$\phi\text{CO}_2 = \frac{A_N - R_L}{\text{PFD} \times \text{Absorbance foliaire}} \quad (7)$$

La relation ϕCO_2 et ϕPSII (cf. figure 29) est ensuite établie à partir des courbes d'assimilations en fonction de la concentration interne en CO_2 obtenues dans une atmosphère à 0,5% de O_2 (absence de photorespiration) conformément à (Ghashghaie and Cornic 1994). Cette relation, approximée par une régression de type sigmoïde ou quadratique peut servir par la suite de courbe d'étalonnage pour l'extrapolation du ϕCO_2 à partir du ϕPSII pour les mesures effectuées dans une atmosphère à 21% d' O_2 .

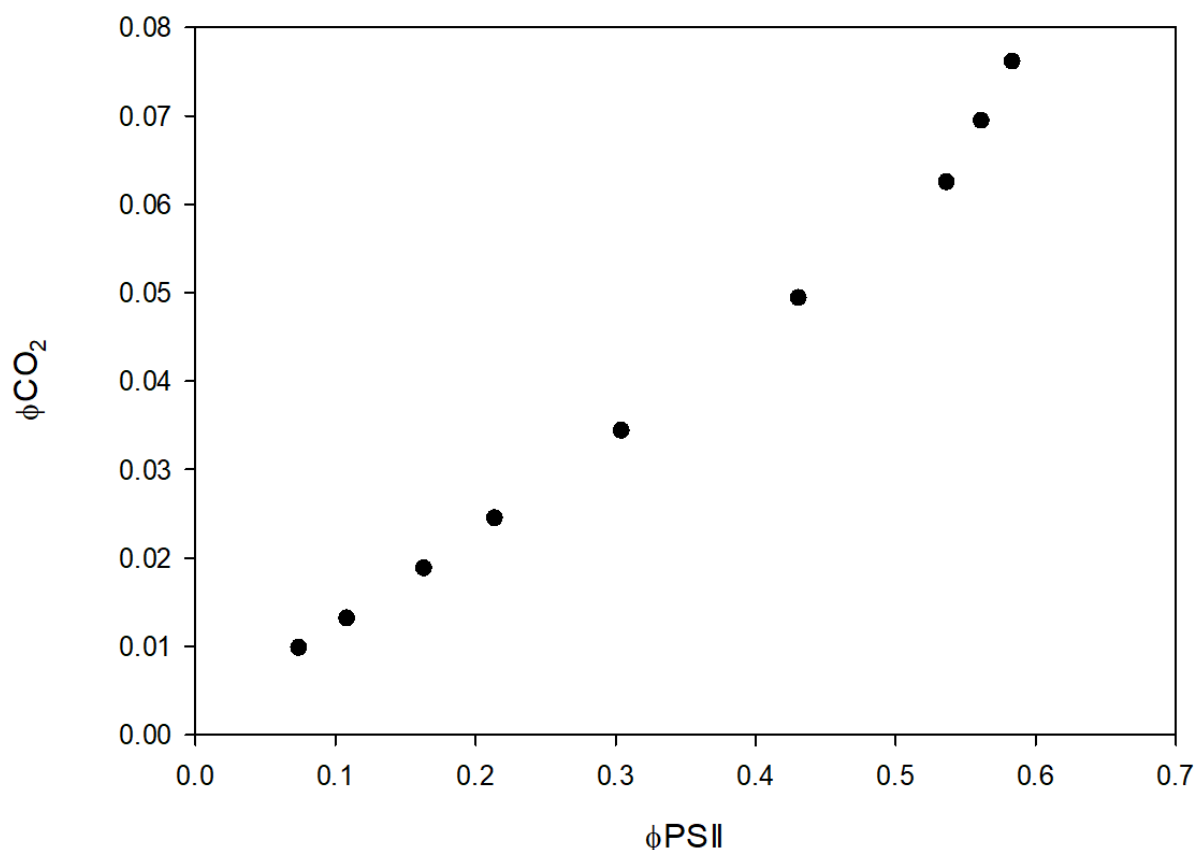


Figure 32 : courbe de calibration de ϕCO_2 en fonction de ϕPSII pour un plant de *Geum montanum* dans une atmosphère contenant 0,5% de O_2

5.2.4. Recalcul des flux électroniques

A l'aide de la courbe de calibration (partie 4.2.3.), il est possible de recalculer la valeur réelle du ϕCO_2 grâce au ϕPSII pour toutes les mesures faites dans une atmosphère normale.

Ensuite, comme décrit dans (Streb *et al.*, 2005), sous le postulat que quatre électrons sont effectivement nécessaires à la fixation d'une molécule de CO_2 on a alors :

$$Jt = \phi\text{CO}_2 \times 4 \times \text{Absorption foliaire} \times \text{PFD} \quad (8)$$

Soit la valeur du flux électronique total au niveau du PSII.

La valeur du δ^* est utilisée pour calculer le facteur de spécificité apparent de la Rubisco (S_{app}) à partir de la relation suivante (Laing *et al.*, 1974) où O est la fraction molaire d'oxygène dans l'atmosphère :

$$S_{app} = \frac{O}{2\delta^*} \quad (9)$$

Le facteur de spécificité permet par la suite de calculer le ratio carboxylation/oxygénation de la Rubisco comme décrit dans (Epron *et al.*, 1995) :

$$\frac{V_c}{V_o} = S_{app} \times \frac{C_i}{O} = R_{C/O} \quad (10)$$

Ce ratio permet de connaître les vitesses de carboxylation et d'oxygénation (respectivement V_c et V_o) puis d'estimer les flux d'électrons alloués respectivement à la photosynthèse (ETR_c) et à la photorespiration (ETR_o).

La vitesse de carboxylation est estimée d'après la relation donnée par (Caemmerer, 2000), à savoir :

$$V_c = A_N - R_L + 0,5 \times V_o \quad (11)$$

$$\text{d'où } V_c = \frac{(A_N - R_L)}{1 - \left(\frac{0,5}{R_{C/O}}\right)} \quad (12)$$

En gardant l'hypothèse de quatre électrons consommés par molécules de CO_2 au cours de la photosynthèse, on a :

$$ETR_c = 4 \times V_c \quad (13)$$

L'activité oxygénase de la Rubisco nécessiterait également quatre électrons par molécules d' O_2 consommés (Kramer and Evans, 2011; Laureau *et al.*, 2013), d'où :

$$ETR_o = 4 \times \frac{V_o}{R_{C/O}} \quad (14)$$

En comparant la somme des électrons alloués aux réactions de la Rubisco ($ETR_c + ETR_o$) avec le flux total d'électrons (J_t), on peut déterminer le flux d'électrons excédentaires qui vont eux, être utilisé dans des flux dit alternatifs tels que la génération de ROS, la PTOX, la réaction de Mehler ou encore la valve malate.

$$ETR_{e_{excès}} = J_t - ETR_c - ETR_o \quad (15)$$

6. Mesures in situ.

6.1. Mesure de photoinhibition.

La mesure de la fluorescence sur le terrain se fait à l'aide d'un mini-Pam (Photosynthesis yield analyzer Mini-Pam, Portable chlorophyll fluorometer, Walz, Effeltrich, Allemagne).

Le Mini-Pam est un appareil portatif permettant de mesurer de manière simple et rapide F_0 , F_m et F_v/F_m .

Sur le terrain, on dispose des leaf-clips sur les feuilles que l'on veut mesurer, permettant de faire une acclimatation à l'obscurité pendant 30min.

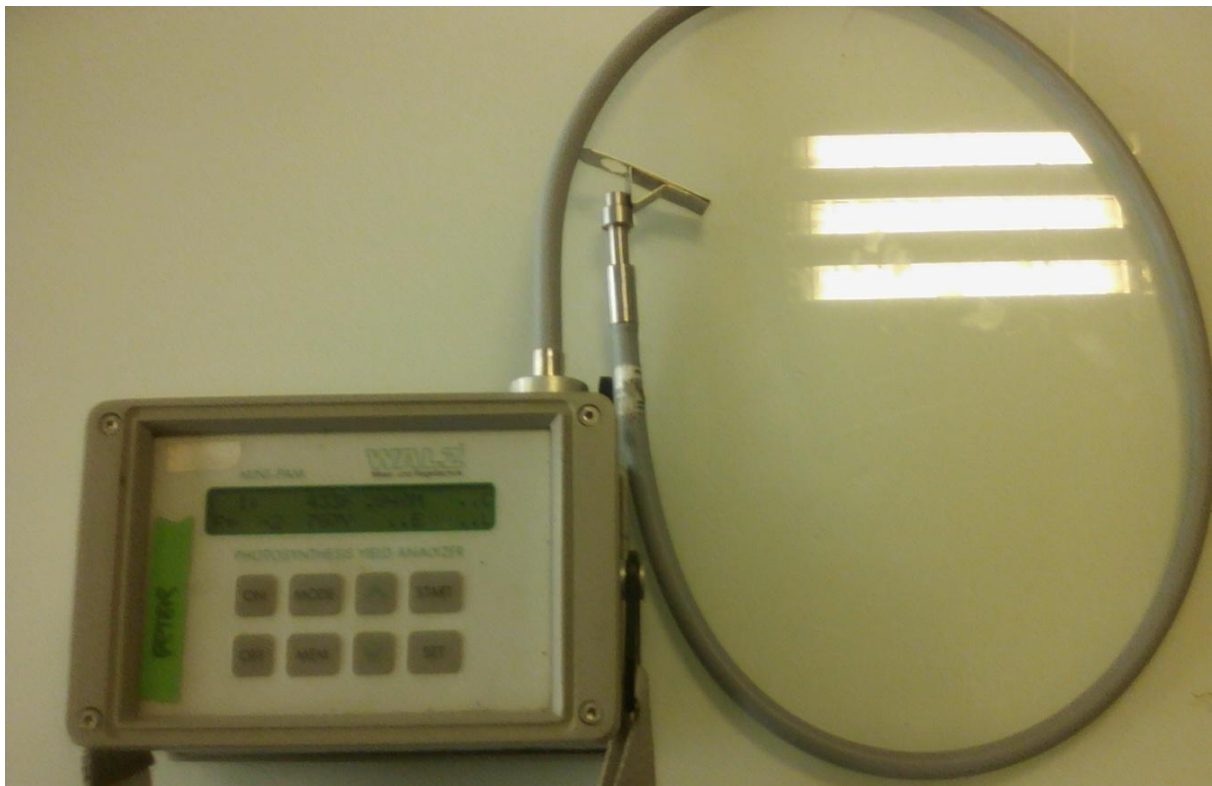


Figure 33: photographie du mini PAM utilisé pour les mesures de photoinhibition in situ



Figure 34:feuille de *Soldanella alpina* sur laquelle ont a positionné un leaf-clip afin de faire la mesure de F_0/F_m

Ensuite, on envois à l'aide du Mini-Pam, un flash de lumière saturante et on note les résultats.

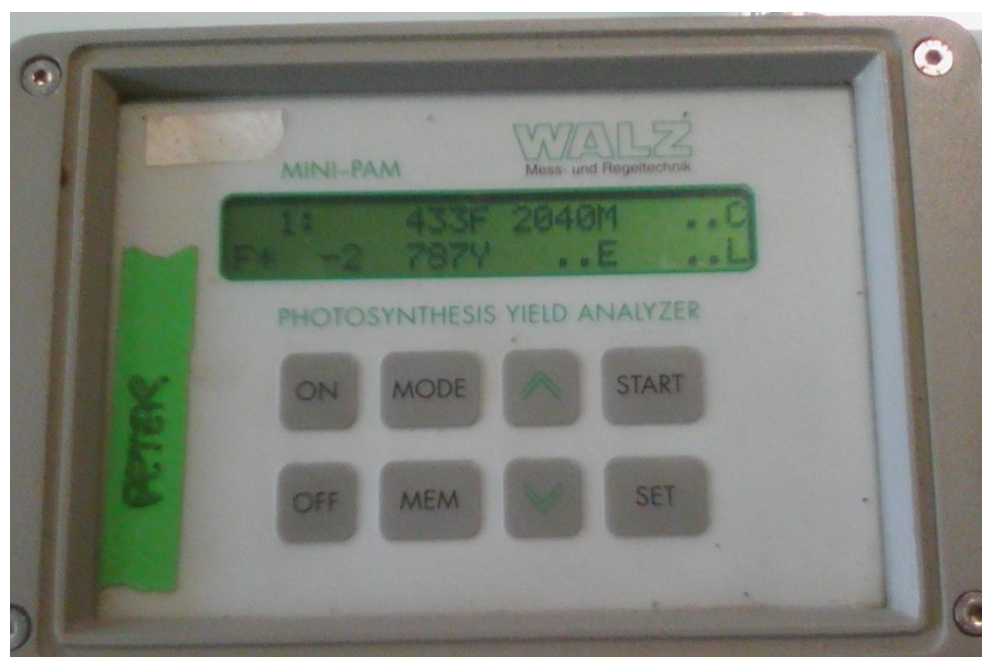


Figure 35: Interface du mini-Pam donnant F_0 (F), F_m (M), F_v/F_m (Y) et la fluorescence variable (F^*)

Les mesures récoltées permettent d'étudier la photoinhibition in situ des feuilles dans leur environnement et en fonction des différentes conditions : plantes ayant poussées à la lumière, à l'obscurité et plantes transférées de l'obscurité à la lumière.

6.2. Quantification non destructive des pigments

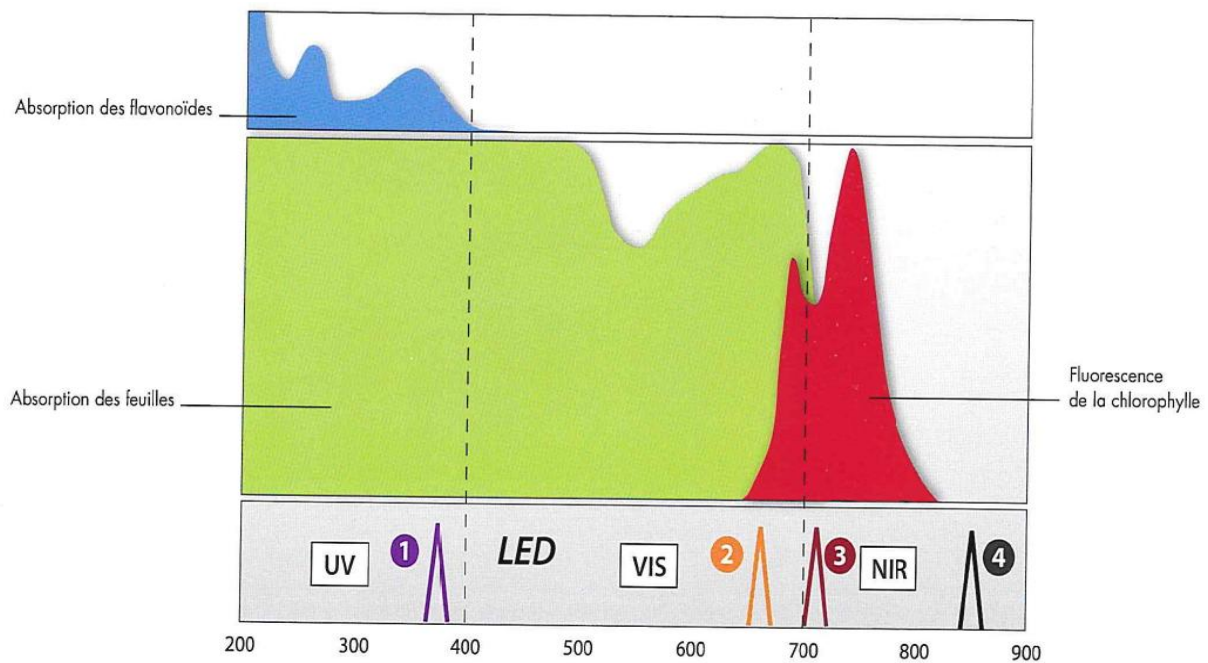
Pour quantifier les pigments de manière non destructive sur le terrain, on utilise 2 dualex®(Force A, Orsay, France) :

- Un dualex® 3.3 flavonoïde
- Un dualex® 4 Scientifique



Figure 36: Dualex 3.3 flavonoïde avec sa pince de mesure

Le dualex® 3.3 flavonoïde est un appareil sous la forme d'une pince permettant une quantification rapide et non destructive des flavonoïdes. Ces derniers étant des composés photo-protecteurs synthétisés en réponse à une luminosité importante et dont l'absorbance se fait dans les UV (à 375nm), l'absorbance UV des feuilles est intrinsèquement lié à la quantité de flavonoïdes présents dans l'épiderme. Leur synthèse est liée aux conditions de croissance des plantes, la mesure de l'absorbance UV des feuilles renseigne ainsi également sur l'environnement lumineux dans lequel elles se sont formées (Laureau *et al.*, 2015b).



La mesure repose sur l'étude de la fluorescence chlorophyllienne induite d'une part par une lumière UV (noté 1 sur la figure 34) et d'autre part par une lumière contrôle rouge (noté 2 sur la figure 34). Les flavonoïdes vont, sous lumière UV, absorber une partie de la lumière soumise à la feuille et la fluorescence chlorophyllienne mesurée sera alors plus faible que sous lumière rouge. En considérant que la diminution de la fluorescence chlorophyllienne est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes, l'appareil mesure alors la quantité de flavonoïdes de la façon suivante :

$$Teneur\ en\ flavonoïdes = \log \left(\frac{fluorescence\ chlorophyllienne\ sous\ lumière\ rouge}{fluorescence\ chlorophyllienne\ sous\ lumière\ UV} \right)$$

De manière plus concrète, la pince du dualix® 3.3 est refermée sur une feuille et l'appareil donne la mesure d'absorbance correspondant à l'absorbance UV et donc aux flavonoïdes épidermiques. Les mesures sont faites à la fois sur la face supérieure et inférieure des feuilles de *Soldanella alpina* et servent à la classification des plantes en deux catégories : plantes de lumière et plantes d'ombre.

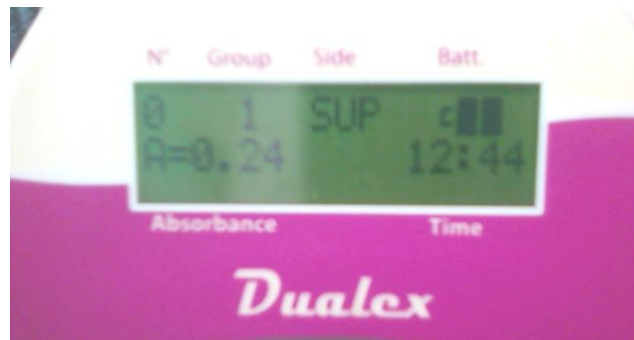


Figure 38: Boitier résultat du Dualex 3.3 flavonoïde donnant en A, l'absorbance des feuilles dans l'UV.

Les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* poussant à la verticale, on a sommé les résultats obtenus pour les faces adaxiales et abaxiales et considéré que les plantes d'ombres étaient les plantes dont la somme des mesures au dualex® 3.3 flavonoïde sur les faces adaxiales et abaxiales était inférieure à 1,5. Pour les plantes de lumière, supérieure à 3,5.

Après catégorisation et marquage des *Soldanella alpina*, certaines plantes d'ombre sont transférées à la lumière par élimination de la végétation alentour et un suivi hebdomadaire des flavonoïdes est effectuée à l'aide du dualex®3.3 flavonoïde.

Le dualex®4 Scientifique permet la mesure non destructive des flavonoïdes et de la chlorophylle. La mesure des flavonoïdes avec cet appareil se fait de la même façon que sur la version 3.3, plus ancienne.



Figure 39: Mesure au Dualex 4 Scientifique d'une feuille de vigne (documentation Force A)

La quantification de la teneur en chlorophylle en revanche, est mesurée via l'étude comparée de la transmittance de la feuille en réponse à deux longueurs d'ondes : une rouge (notée 3 sur la figure 39) et une infrarouge (notée 4 sur la figure 39). La longueur d'onde 3 peut être absorbée par la chlorophylle de manière spécifique alors que la longueur d'onde 4 non. La différence de transmittance de la feuille est proportionnelle à la quantité de chlorophylle et peut donc se calculer comme suit :

Teneur en chlorophylle

$$= \log \left(\frac{\text{Transmittance infrarouge} - \text{transmittance lumière rouge}}{\text{Transmittance lumière rouge}} \right)$$

La longueur d'onde 4 permet de tenir compte des effets de structure potentiels.

Le dualex 4 Scientifique permet de faire un suivi pendant un mois de la teneur en chlorophylle et en flavonoïdes sur le terrain des feuilles de *Soldanella alpina* marquées et correspondant aux conditions ombre, lumière et celles transférées de la lumière à l'obscurité.

Plus ponctuellement, le dualex 4 Scientifique permet également de faire une mesure de la teneur en chlorophylle et en flavonoïde avant ou après mesure d'une plante à l'aide du Licor ou de la caméra.

7. Quantification chimique des activités enzymatiques et des pigments chlorophylliens.

7.1. Quantification chimique des pigments.

Pour doser les pigments, on utilise environ 0.3g de feuilles fraîches, broyées à basses températures sur de la glace dans 5mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50mM, pH 7,5.

On prélève 1 mL du broyat et le dilue dans 4 volumes d'acétone pur. L'acétone permet l'extraction de la chlorophylle et des caroténoïdes. Pour maximiser l'extraction, on vortexe les échantillons puis on les laisse reposer au minimum 30 min à l'obscurité.

On centrifuge ensuite les échantillons pendant 10 minutes à 4°C (10 000g) afin d'éliminer les débris cellulaires et on isole le surnageant contenant les pigments.

On prend ensuite 1mL de surnageant dans des cuves en quartz ou des cuves optiques et on mesure l'absorbance de l'échantillon au spectrophotomètre à trois longueurs d'ondes caractéristiques des spectres d'absorptions de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes : 664nm, 646nm et 453nm, et une longueur d'onde servant à la correction des absorbances : 750nm.

Le zéro est effectué à l'aide d'une solution d'acétone dilué à 80% (v/v).

Les quantités de chlorophylle et de caroténoïdes sont calculés selon (Porra *et al.*, 1989; Porra, 2002) et selon (Urbach *et al.*, 1983) :

$$\text{Chlorophylle a (mg/L)} = 11,78 \times (A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) - 2,29 \times (A_{646 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}})$$

$$\text{Chlorophylle } b \text{ (mg/L)} = 20,05 \times (A_{646 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) - 4,77 \times (A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}})$$

$$\text{Chlorophylle totale (mg/L)} = \text{Chlorophylle } a + \text{Chlorophylle } b$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/L)} = 4,76 \times (A_{453 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) - 0,226 \times \text{Chlorophylle totale}$$

7.2. Quantification chimique des activités enzymatiques.

7.2.1. Extraction et dosage des protéines

Extraction

Pour l'extraction des protéines telles que la catalase, la glutathion réductase, l'ascorbate peroxydase (vacuole) et la glycolate oxidase, le protocole est similaire à celui décrit précédemment (§6.1.) pour l'extraction des pigments. A savoir, l'extrait se fait à partir d'environ 0.3g de feuilles fraîches, broyées à basses températures sur de la glace dans 5mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50mM, pH 7,5. Le broyat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 10 000g et le surnageant est utilisé pour les mesures d'activités enzymatiques.

Pour l'ascorbate peroxydase chloroplastique en revanche, un protocole d'extraction différent est nécessaire car l'ascorbate peroxydase chloroplastique est extrêmement sensible et se désactive immédiatement en l'absence d'ascorbate dans le milieu d'extraction. Les feuilles fraîches (environ 0.3g) sont homogénéisées à 4°C dans 4mL d'un tampon phosphate à 0,1M, pH 7,5.

Les extraits sont filtrés au travers de 8 couches de gazes puis centrifugés à 35000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé ensuite pour le calcul de l'activité ascorbate peroxydase.

Dosage

Afin d'être plus précis dans la caractérisation des activités enzymatiques, on normalise cette activité par la quantité de protéine totale.

La quantité de protéine totale est mesurée selon la méthode de Lowry comme suit :

On prend 1 mL de surnageant de l'extrait protéique et on le dilue dans 10mL de TCA à 20% (v/v). Le mélange est vortexé puis laissé reposer à température ambiante pendant au moins 12h. Cette première étape permet de faire précipiter les protéines et de les séparer des acides aminés en solution.

Pour s'assurer d'avoir les protéines précipitées dans le culot, on effectue une première centrifugation à température ambiante de 15min à 5 000g. Le surnageant est

jeté et on resuspend le culot dans 1mL de TCA à 5% (v/v). Cette deuxième étape permet de parfaire le nettoyage des protéines et d'éliminer toute trace d'acides aminés solubles.

Après avoir vortexé l'échantillon, on centrifuge de nouveau à température ambiante pendant 15 minutes (à 5 000g.) pour concentrer les protéines dans le culot. Et on jette le surnageant.

On ajoute ensuite 0,5mL d'une solution de NaOH 0,1N pour resuspendre le culot puis on ajoute 0,5mL d'H₂O. En parallèle, on prépare une gamme étalon avec différentes concentrations de BSA.

On prend les solutions de la courbe étalon et les échantillons préparés et on ajoute 1mL d'une solution contenant 2% de CuSO₄ (v/v), 2% de KNA-Tartrate (v/v) et 10% de Na₂CO₃.

On vortexe et on laisse reposer 5 min.

On ajoute enfin 3mL de réactif de Folin 10% et on mesure l'absorbance à 540nm après 1h.

La quantité de protéine totale dans les échantillons est calculée à posteriori à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue.

7.2.2. Activité de la catalase (EC1.11.1.6)

La catalase est une enzyme présente dans les péroxysomes. C'est une oxydoréductase composée de 4 hèmes qui permettent la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Pour étudier son activité, on regarde donc la rapidité de détoxification d'une quantité donnée de peroxyde d'hydrogène au contact des extraits protéiques à tester.

La cinétique est enregistrée sur une durée de 60 secondes.

Dans la pratique, on ajoute dans une cuve en quartz 20μL d'extrait à 2,98 mL d'un milieu réactionnel composé de tampon phosphate KH₂PO₄/K₂HPO₄ à 100mM, pH7 et de 80μL de H₂O₂ à 30%. Le mélange est agité puis son absorbance à 240nm est suivit pendant 60 secondes.

L'activité de la catalase (en μmol de H₂O₂ dégradées par seconde et par cm₂) est ensuite calculée comme suit :

Activité catalase

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbance}}{\Delta t} \times \text{volume total broyat} \times \text{volume cuvette}}{\text{surface foliaire} \times \epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times \text{volume échantillon testé} \times \text{longueur cuvette} \times \text{poids frais}}$$

Avec $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$ qui vaut 36 cm²/mmol.

7.2.3. *Activité de la glutathion reductase (EC 1.6.4.2)*

La glutathion réductase est une enzyme qui permet de maintenir de haut niveau en glutathion, un antioxydant. Pour ce faire, elle catalyse la réaction de réduction du disulfure de glutathion en glutathion à l'aide de NADPH.

Comme pour réduire le glutathion la glutathion réductase a besoin de NADPH, on étudie sa cinétique enzymatique en mesurant la rapidité d'utilisation du NADPH par la glutathion réductase en présence d'un excès de disulfure de glutathion.

En pratique, on prépare un milieu réactionnel contenant du tampon K-PO₄ à 0,4M, pH8 ; du Na-EDTA à 2,4 mM, pH 8 et du disulfure de glutathion (GSSG) à 30mM. On ajoute ensuite 0,1mL d'extrait enzymatique et 0,05mL de NADPH à 10mM.

Dès l'introduction du NADPH, la réaction débute et on suit la variation d'absorbance à 340nm.

On effectue en parallèle deux contrôles. Un premier où le GSSG est remplacé par de l'eau, et un second où l'on travaille sans l'extrait.

L'activité de la glutathion réductase (en μmoles de NADPH oxydées par secondes par cm²) est ensuite calculée comme suit :

Activité glutathion reductase

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbance}}{\Delta t} \times \text{volume total broyat} \times \text{volume cuvette}}{\text{surface foliaire} \times \epsilon_{\text{NADPH}} \times \text{volume échantillon testé} \times \text{largueur cuvette} \times \text{poids frais}}$$

Avec ϵ_{NADPH} qui vaut $6,2 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mmol}$.

7.2.4. *Activité de l'ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)*

7.2.4.1. Dans la vacuole

L'ascorbate peroxidase est une oxydoreductase qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate comme substrat. On peut donc suivre sa cinétique en étudiant l'évolution d'une quantité initiale donnée en ascorbate.

Pour ce faire, on ajoute 10 à 50μL d'extrait à un milieu réactionnel contenant 50 μL de H₂O₂ 4mM et 100μL de Na-Ascorbate 8mM dilué dans 800 à 840μL de tampon K-PO₄ 0,1M, EDTA 5mM, pH 7,5. 7

On agite le mélange puis on mesure l'évolution de l'absorbance à 290nm.

On effectue en parallèle deux contrôles. Un premier où l'extrait est remplacé par du tampon, et un second où le H₂O₂ est substitué par du tampon.

L'activité de l'ascorbate peroxidase (en μmoles d'ascorbate oxydées par secondes par cm²) est ensuite calculée comme suit :

Activité ascorbate peroxidase

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbance}}{\Delta t} \times \text{volume total broyat} \times \text{volume cuvette}}{\text{surface foliaire} \times \epsilon_{\text{ascorbate}} \times \text{volume échantillon testé} \times \text{largeur cuvette} \times \text{poids frais}}$$

Avec $\epsilon_{\text{ascorbate}}$ qui vaut $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2.4.2. Dans le chloroplaste

L'activité de l'ascorbate peroxydase chlorophyllienne est basée sur le même principe que pour l'ascorbate présente dans la vacuole. L'évolution de la quantité initiale donnée en ascorbate à l'aide d'un spectrophotomètre à température ambiante.

L'extrait est ajouté à un milieu de réaction composé d'un tampon phosphate 0,1M additionné de 5mM EDTA, 0,2mM d'acide ascorbique, 0,1mM de peroxyde d'hydrogène et 50mM de HEPES-Na-OH à pH 7,6.

L'absorbance est ensuite suivie à 290nm.

7.2.5. *Activité de la glycolate oxidase (EC 1.1.3.1)*

La glycolate oxidase est une oxydoréductase qui intervient au niveau des peroxysomes dans la photorespiration. Elle permet de catalyser l'oxydation du glycolate en glyoxylate.

L'étude de la cinétique de la glycolate oxidase se fait en suivant l'évolution de la quantité de glyoxylate. Le glyoxylate réagit en effet de manière spontanée avec la phénylhydrazine pour former un composé (la glyoxylate-phénylhydrazone) qui absorbe dans les UV à 324nm.

Pour ce faire, on travaille avec un milieu réactionnel composé d'eau distillée, d'un tampon Triethanolamine 0,05M pH 7,8, de 0,5% de Triton (v/v), de 12mM de FMN (flavine mononucléotide), de 0,1M de phénylhydrazinehydrochloride pH 6,8 et de l'extrait protéique.

On démarre la réaction en ajoutant à ce milieu réactionnel 0,3M de glycolate pH 7,0.

Le mélange est ensuite agité, puis incubé 4 minutes à température ambiante.

On suit ensuite l'évolution de l'absorbance à 324nm pendant 3 minutes au spectrophotomètre.

On effectue en parallèle deux contrôles. Un premier où l'extrait est remplacé par du tampon, et un second où le glycolate est substitué par du tampon.

L'activité de la glycolate oxidase (en μmoles de glyoxylate formées par secondes par cm^2) est ensuite calculée comme suit :

Activité glycolate oxidase

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbance}}{\Delta t} \times \text{volume total broyat} \times \text{volume cuvette}}{\text{surface foliaire} \times \varepsilon_{gp} \times \text{volume échantillon testé} \times \text{largeur cuvette} \times \text{poids frais}}$$

Avec Δt en secondes, le poids frais en g, la largeur de la cuvette en cm, les volumes total et volume cuvette en mL, le volume d'échantillon testé en μL et $\varepsilon_{\text{glyoxylate-phénylhydrazone}}$ (noté ε_{gp}) qui vaut $1,7 \times 10^7 \text{ mL.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

7.2.6. Activité de la NADP-Malate déshydrogénase (EC 1.1.1.82)

La NADP malate déshydrogénase (noté NADP-MDH) est une oxydoréductase qui permet la formation de pouvoir réducteur NADPH à l'aide de NADP et de malade tout en produisant de l'oxaloacetate.

Des disques de feuilles de surface connues sont congelées dans de l'azote liquide afin de stopper le métabolisme immédiatement. Les disques foliaires sont ensuite broyé à 77K jusqu'à obtenir une poudre très fine qui est resuspendu dans 0,5mL d'un tampon d'extraction composé de 0,1M de Tris-HCl (pH 7.4), 20mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 20% glycérol (v/v) et 50mM DTT.

L'échantillon est vortexé et incubé pendant 10 minutes à 25°C puis l'activité maximale est déterminée en suivant au spectrophotomètre l'oxydation du NADP à 334nm.

L'activité maximale de la NADP-MDH dans 1mL d'un mélange réactionnel composé de 0,1 M Tris-HCl (pH 7.9), 20mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 0,1 mM NADPH, 0,5mM oxaloacetate et 50 μL d'extrait.

8. Quantification et identification des flavonoïdes

8.1. Extraction des flavonoïdes

Les feuilles de *Soldanella alpina* ayant poussées à de fortes luminosités, à de faibles luminosités et les *Soldanella alpina* transférées d'une lumière faible à une lumière forte sont prélevées sur le site du Lautaret après mesure au Dualox de l'absorption UV et conservées dans l'azote liquide.

L'extraction se fait dans un solvant composé de méthanol à 70% (v/v) acidifié avec 0,1% HCL et 500 μM de 5-O-methoxyflavone. Le 5-O-methoxyflavone est proche des

flavonoïdes présent chez *Soldanella alpina* mais n'est pas synthétisé par la plante. Il sert donc de standard interne pour estimer les pertes au cours de l'extraction.

8.2. Caractérisation des flavonoïdes par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est utilisée afin d'identifier les différents flavonoïdes présents dans les extraits des feuilles de *Soldanella alpina* prélevées sur les terrains du Lautaret.

Dans un premier temps, on effectue une séparation grossière des métabolites présents dans l'extrait. Pour cela, une chromatographie en phase liquide est effectuée avec un débit de 0,4mL/min et une température de 55°C sur un chromatographe en phase liquide à haute performance (Acquity H-class ultra high performance liquid chromatography UPLC system, Waters Corps., Milford, MA) avec une colonne Kinetex C17 100 Å (100x2.1mm, 2.6µm beads, Phenomenex, France).

La phase mobile est constituée de deux solvants, de l'eau pure acidifiée avec 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acetonitrile acidifié avec 0,1% d'acide formique (solvant B).

La caractérisation des différentes éluions se fait avec un spectrophotomètre de masse à haute définition Synapt G2-S (Waters Corp., Milford, MA) équipé d'une source ionisante par électronébulisation permettant de connaître la composition élémentaire des ions. Le spectrophotomètre de masse est utilisé à la fois en mode ionisation positive et ionisation négative.

Le voltage capillaire est de 3kV tout au long de l'éluion. Un deuxième spectrophotomètre de masse à temps de vol est utilisé en tandem pour avoir une meilleure résolution. Les données sont acquises en mode Fast-DDA (Analyse de données directe) afin que le passage des deux ions les plus abondants, déclenche l'analyse en simultané.

Le spectrophotomètre de masse à temps de vol est calibré de 50 à 1500m/z à l'aide d'un mélange d'acide phosphorique dans une solution 1 :1 d'eau et d'acéonitrile. La précision ainsi obtenue est de l'ordre de 3ppm.

Les paramètres du spectrophotomètre Synapt ont été optimisés en utilisant un standard composé d'acide chlorogénique de la manière suivante : les cônes d'échantillons ont été paramétrés à 20V, la source et la température d'éluion réglées respectivement à 120 et 600°C. De plus, un blanc a été passé avant chaque échantillon afin de pouvoir soustraire des résultats de spectrophotométrie de masse le bruit de fond.

Chaque échantillon a ensuite été traité avec le logiciel MassLynx (V4.1).

Une fois la séparation et la caractérisation grossière des métabolites effectuées, une caractérisation plus fine de chaque pic majeur est faite.

Pour cela, on a utilisé un spectrophotomètre de masse Micromass ZQ ESCi multimode (Micromass Ltd, Manchester, UK) équipé d'un ionisateur par électronébulisation (Zspray MKII). La résolution plus faible de ce spectrophotomètre permet d'injecter de plus grand volume donc d'injecter la même quantité de métabolites mais plus dilué. La dilution permise des échantillons par l'usage de ce spectrophotomètre évite à l'extrait de précipiter et fausser les mesures.

La séparation des différents métabolites se fait par chromatographie en phase liquide avec la même phase mobile et la même colonne que précédemment. Compte tenue de la plus grande dilution des échantillons, on choisit en revanche cette fois un débit plus important (21,0mL/min) avec une pompe binaire HPLC (Waters 1525I, Waters, Manchester, UK). La source et le capillaire sont chauffés respectivement à 80 et 350°C. Le voltage capillaire choisit pour cette phase est de 2,5kV et on utilise de l'azote à des débits de 350L/h et 50 L/h, respectivement pour la désolvation et le cône.

L'identification des différentes molécules éluées est suivie à l'aide du Micromass ZQ toutes les 0,5s. En parallèle, les spectres d'absorbance entre 210 et 800 nm des différents composés sont enregistrés à l'aide d'un détecteur à photodiode Waters 996.

Les données sont ensuite étudiées avec le logiciel MassLynx (V. 3.5, Micromass Ltd.)

Les résultats des deux phases de cette expérience permettent d'identifier les différents métabolites contenus dans les feuilles de *Soldanella alpina* suivant le temps de rétention de chaque molécule, leur spectre d'absorbance (notamment dans l'UV), leur ratio masse/charge (m/z) et leur schéma de fragmentation. Pour plus de précision, certains composés ont été comparés avec leur équivalent standard du commerce traité selon le même protocole.

8.3. Recherche des flavonoïdes participant à la protection UV dans les épidermes et les mésophiles adaxiales et abaxiales des feuilles de *Soldanella alpina*.

Pour chercher les flavonoïdes participant à la protection UV des feuilles de *Soldanella alpina* dans l'épiderme et le mésophile, on commence par récolter environ 25mm² d'épiderme abaxial sur les feuilles fraîches. On les extrait immédiatement dans 100μL d'un mélange de méthanol à 70% (v/v) acidifié avec 0,1% HCl.

Le mésophile étant mis à jour par le retrait de l'épiderme, on échantillonne ensuite celui-ci et on l'extrait de la même manière.

Enfin, on répète le même procédé pour l'épiderme et le mésophile de la face adaxiales.

La surface de tissus collectée est à chaque fois estimée grâce à des images prises au microscope.

Une fois les échantillons extraits, ils sont d'abord congelés à -70°C dans de l'azote liquide et décongelé 3 fois à l'obscurité, puis soniqué à 0°C pendant 15 minutes avant d'être conservé à -20°C. Ces différentes étapes permettent de casser toutes les cellules.

Après décongélation des extraits, on les centrifuge à 18 000 g pendant 15 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et on utilise le surnageant pour l'analyse chromatographique.

20µL du surnageant est injecté dans le système de chromatographie Rheodyn.

On cherche également à déterminer les flavonoïdes présents dans la cuticule. Pour cela, 5g de feuilles de *Soldanella alpina* déshydratées à froid sont mélangées par 3 fois dans 5mL de chloroforme. A chaque fois, le liquide est agité pendant 3 minutes pour séparer la cuticule de l'épiderme.

Au bout de la 3^{ème} extraction, les extraits de chloroforme sont combinés et évaporé sous pression pour obtenir un extrait concentré de la cuticule. Cet extrait est ensuite dilué dans du méthanol à 70% (v/v) et analysé par spectrophotométrie de masse. La même extraction est réalisée avec de l'hexane et de l'acétone.

9. Analyse anatomique

L'analyse anatomique des feuilles de *Soldanella alpina* s'est fait sur la surface de feuilles entières et sur des coupes transversales. Les feuilles utilisées proviennent de plantes prélevées sur le terrain, mises en pots et transportées sur Paris. Pendant le transport les plantes sont régulièrement hydratées.

Les prélèvements de feuilles et les coupes transversales ont été faites et montées dans de l'eau avec du Tween 20 (0,5%, v/v)(Sigma, St Louis, MO, USA) au laboratoire ImagoSeine (institut Jacques Monod, Paris) dans les 72h suivant le prélèvement des plantes sur le terrain.

Les images de la surface des feuilles et des coupes transversales de feuilles ont été obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence (AxioObserver Z1, Zeiss) équipé d'une caméra monochrome sCMOS (ORCA-Flash4.0LT, Hamamatsu), d'une caméra

couleur CCD (Axiocam HRc, Zeiss) et d'une LED (pE-300 white, CoolLED) pour permettre d'exciter la fluorescence.

Plusieurs paramètres descriptifs de l'anatomie foliaire ont été étudiés.

Tout d'abord, la densité stomatique a été examinée. Pour ce faire la fluorescence des feuilles a été excitée sous lumière UV avec un filtre d'excitation 300WB80 (Omega), un diviseur de faisceaux dichroïque long (390DRLP02, Omega) et un filtre d'émission 450WB80 (Omega). Le comptage des stomates sur les faces adaxiales et abaxiales permet d'établir la densité stomatique.

Ensuite les épaisseurs de la feuille, du parenchyme palissadique et du mésophile sont étudiées. Pour ce faire on utilise les coupes transversales de feuilles, réalisées à la main à l'aide d'une lame de rasoir et on excite la fluorescence sous lumière UV avec un filtre d'excitation 330WB80 (Omega), un diviseur de faisceaux dichroïque long (DCLP400, Omega) et un filtre d'émission LP400 (Omega). Les images sont obtenues à l'aide d'un objectif Plan-Apochromat 10x NA 0.45, Zeiss.

Pour permettre une meilleure répétabilité des prises d'images, celles-ci étaient automatisées par le biais du logiciel Zen (Zen 2 blue edition, Zeiss) et les images étaient ensuite traitées via le logiciel d'imagerie ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA)

10. Spectre de fluorescence chlorophyllienne à 77k

Pour faire les spectres de fluorescence chlorophyllienne à 77k on a prélevé des échantillons de feuilles sur le terrain et on les a directement plongé dans l'azote liquide pour arrêter le métabolisme et les conserver.

Le protocole suivis est ensuite inspiré de (Weis, 1985). Les échantillons (feuilles) sont broyées dans l'azote liquide avec du sable de fontainebleau afin de diluer l'échantillon et de limiter les phénomènes de réabsorption de la fluorescence qui pourraient fausser les résultats.

Une fois une poudre fine et homogène obtenue, un peu du broyat est déposé dans un petit récipient.

Une lamelle de verre est ajoutée au dessus pour éviter que la fibre optique ne soit rayée par le sable de fontainebleau.

La poudre et la fibre optique sont ensuite plongée dans l'azote liquide et la fluorescence est enregistrée et suivie sur l'ordinateur. La fluorescence est enregistrée entre 650nm et 800nm.

Les spectres obtenus sont normalisés par la fluorescence du PSII (à 695nm) afin de pouvoir comparer les différentes conditions étudiées sans que n'entrent en compte les différences de concentration en chlorophylle des différents échantillons ou les différences de quantité d'échantillon testées.

11. Etude de la vitesse de ré oxydation du pool de quinone.

La vitesse de ré oxydation du pool de quinone peut être estimée par le biais d'une étude dynamique de la fluorescence chlorophyllienne.

Pour ce faire, on utilise une caméra Hamamatsu (Digital Caméra C9300) permettant l'enregistrement de la fluorescence, combiné à un système d'éclairage à LED.

Le logiciel Speedzen Deep Green II (version 1.3.5, JBeamBio, Marsais, France) permet de contrôler l'acquisition des données ainsi que le système d'éclairage.

Les mesures sont effectuées sur les plantes de *Soldanella alpina* et *Geum montanum* excavées sur les terrains du Col du Lautaret et du Galibier et transportées ensuite au laboratoire ainsi que décrits dans le paragraphe 2.2. Les conditions étudiées sont : feuilles sous la neige, vieilles feuilles et jeune feuilles. Pour *Soldanella alpina* on s'attache aussi à comparer la vitesse de ré oxydation du pool de quinone des feuilles ayant poussées dans des conditions de forte et de faible lumière.

Les plantes sont tout d'abord acclimatées à l'obscurité pendant 30 minutes afin de permettre l'inactivation du cycle de Calvin et l'ouverture de tous les centres réactionnels.

Un premier flash de lumière saturante (durée intensité) est appliqué et servira de contrôle. Ce premier flash permet la sélection de 10 à 15 points de mesures pour chaque plantes étudiées.

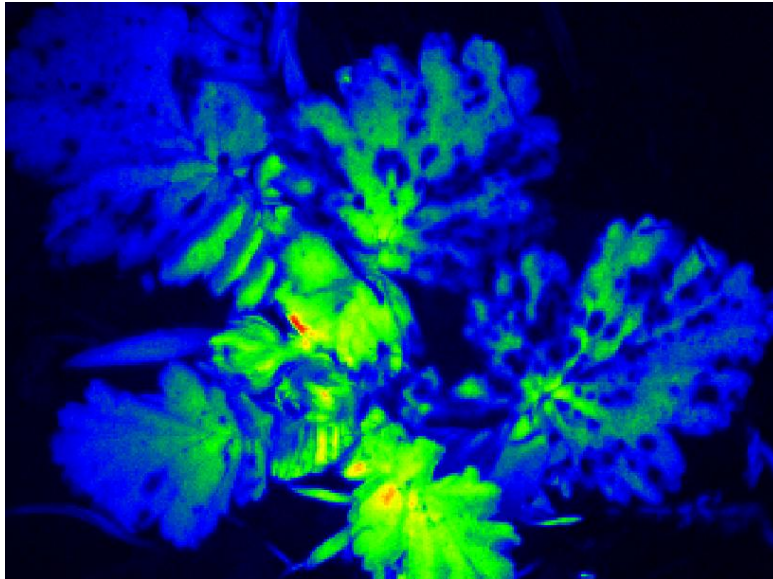


Figure 40: Image de la fluorescence chlorophyllienne sur des feuilles de *Geum montanum* obtenues avec la caméra. La sélection des points de mesures sont sélectionnés sur cette image.

Par la suite, l'étude de la vitesse de ré oxydation du pool de quinone repose sur l'application de deux flashes saturant successifs de 0,1s à un intervalle de temps compris entre 0s et 150s et le suivi de la fluorescence du second flash au niveau des points de mesures précédemment défini.

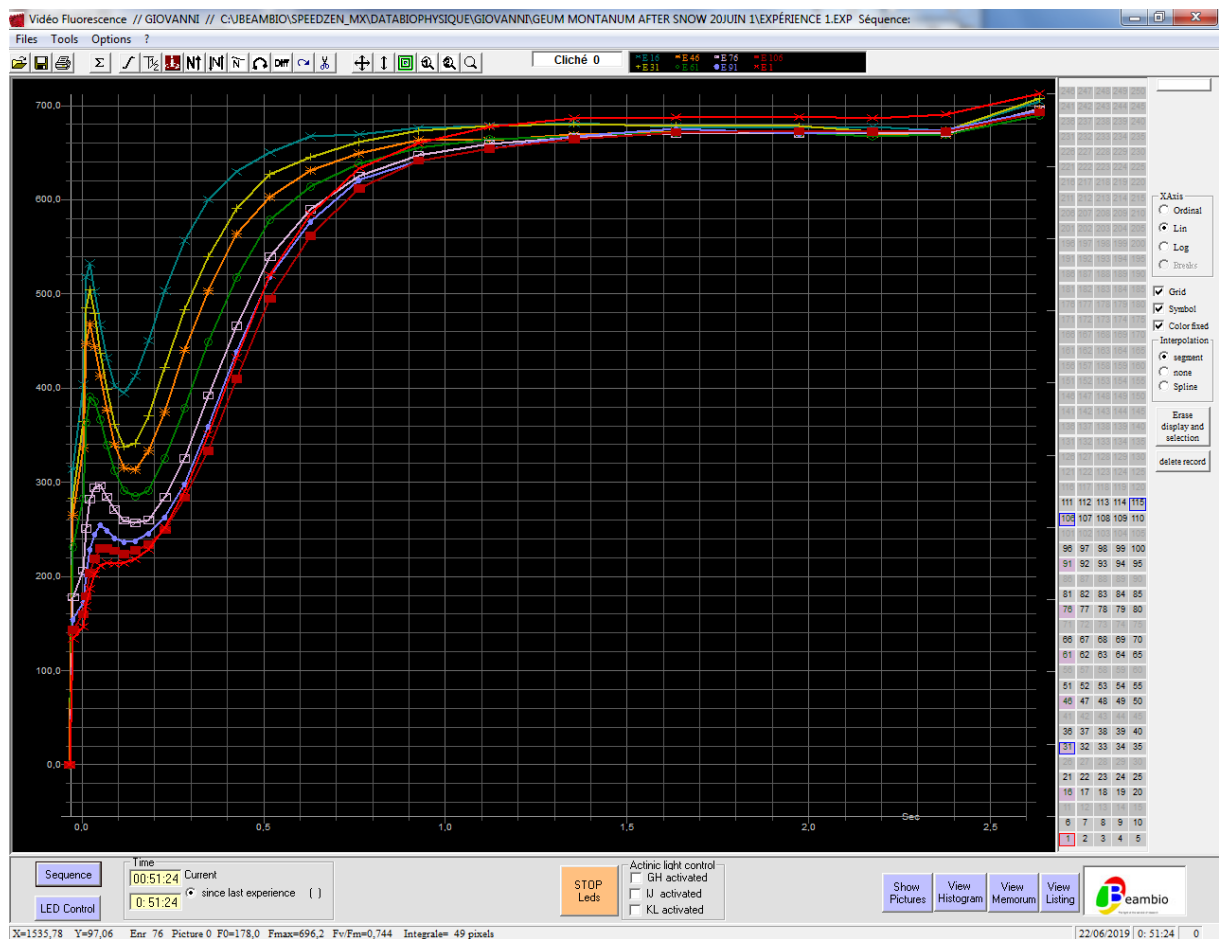


Figure 41: exemple du résultat obtenu à l'écran directement après un flash. Les différentes courbes présentées correspondent à l'induction à la lumière du deuxième flash au niveau d'un même échantillon avec des temps entre les deux flashes variables.

C'est l'aire au dessus de la courbe de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de quinone oxydée. Et on s'attend à ce que plus on laisse de temps entre les deux flashes successifs, plus les quinones ont de temps pour se réoxyder et plus la quantité de quinones oxydées sera importante. La différence du nombre de quinones oxydées par rapport au temps écoulé entre les flashes nous permet de connaître la cinétique de réoxydation des quinones.

A l'aide d'un outil présent dans le logiciel Speedzen Deep Green II, on mesure l'aire au dessus de chaque courbe et on en calcule une moyenne.

La variation de l'aire au dessus de la courbe en fonction de la durée entre les deux flashes est de qui nous donne la vitesse de réoxydation du pool de quinone.

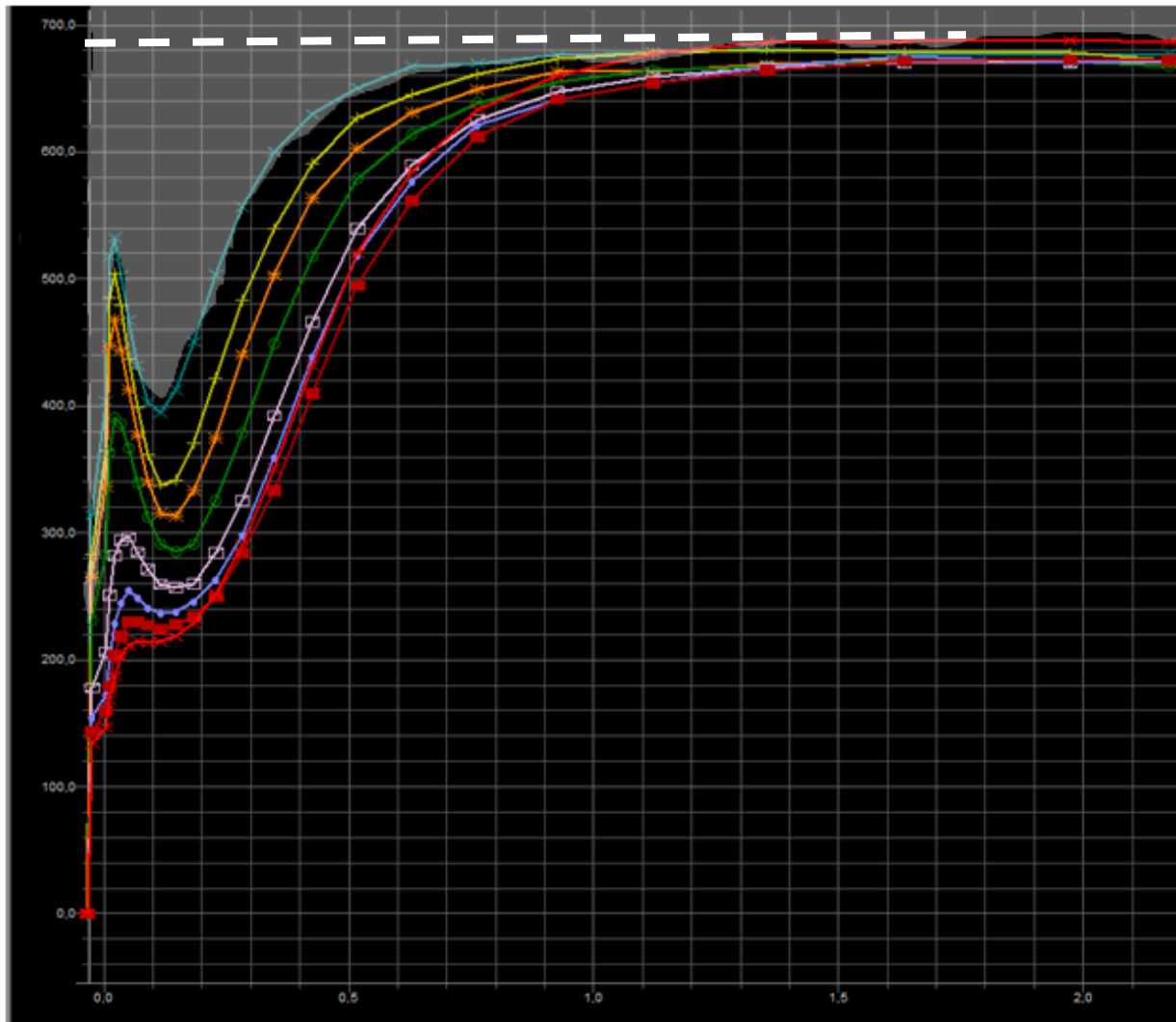


Figure 42: exemple de mesure de l'aire au dessus d'une courbe à l'aide du logiciel SpeedZen Green II. La ligne en pointillé correspond au plateau de la courbe qui sert de référence pour la mesure de l'aire au dessus de la courbe. La partie grisée correspond à l'aire au dessus de la courbe.

12. Traitement statistique des données.

Le traitement statistique des données se fait à l'aide du logiciel de statistique R Studio version 1.2.5033 (RStudio, Inc., 2019).

Dans un premier temps, les données sont représentées graphiquement afin de pouvoir déterminer et supprimer des listes de données celles qui sont aberrantes.

La normalité et l'homoscédasticité des données restantes sont ensuite testées respectivement à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett en considérant un risque d'erreur de premier type (α) de 5%.

Pour les échantillons de petites tailles (<10 réplicats), en cas de doute sur la normalité et l'homoscédasticité des données, le test de Levene est fait en considérant toujours un risque d'erreur de premier type (α) de 5%.

Pour les données suivant une loi normale et pour lesquelles les variances sont homogènes, une ANOVA (Analyse de Variance) ou un test T sont réalisés pour déterminer s'il y a des différences significatives entre les différentes conditions. Le risque d'erreur de premier type (α) considéré est de 5%.

Pour les données ne suivant pas une loi normale et pour lesquelles les variances ne sont pas homogènes, un test de Kruskal-Wallis ou des tests non paramétriques sont réalisés pour déterminer s'il y a des différences significatives entre les différentes conditions. Le risque d'erreur de premier type (α) considéré est de 5%.

Les valeur-p correspondantes aux tests d'ANOVA, de Kruskal-Wallis, test T ou autres sont précisées en légendes des graphiques.

13. Récapitulatif des mesures effectuées.

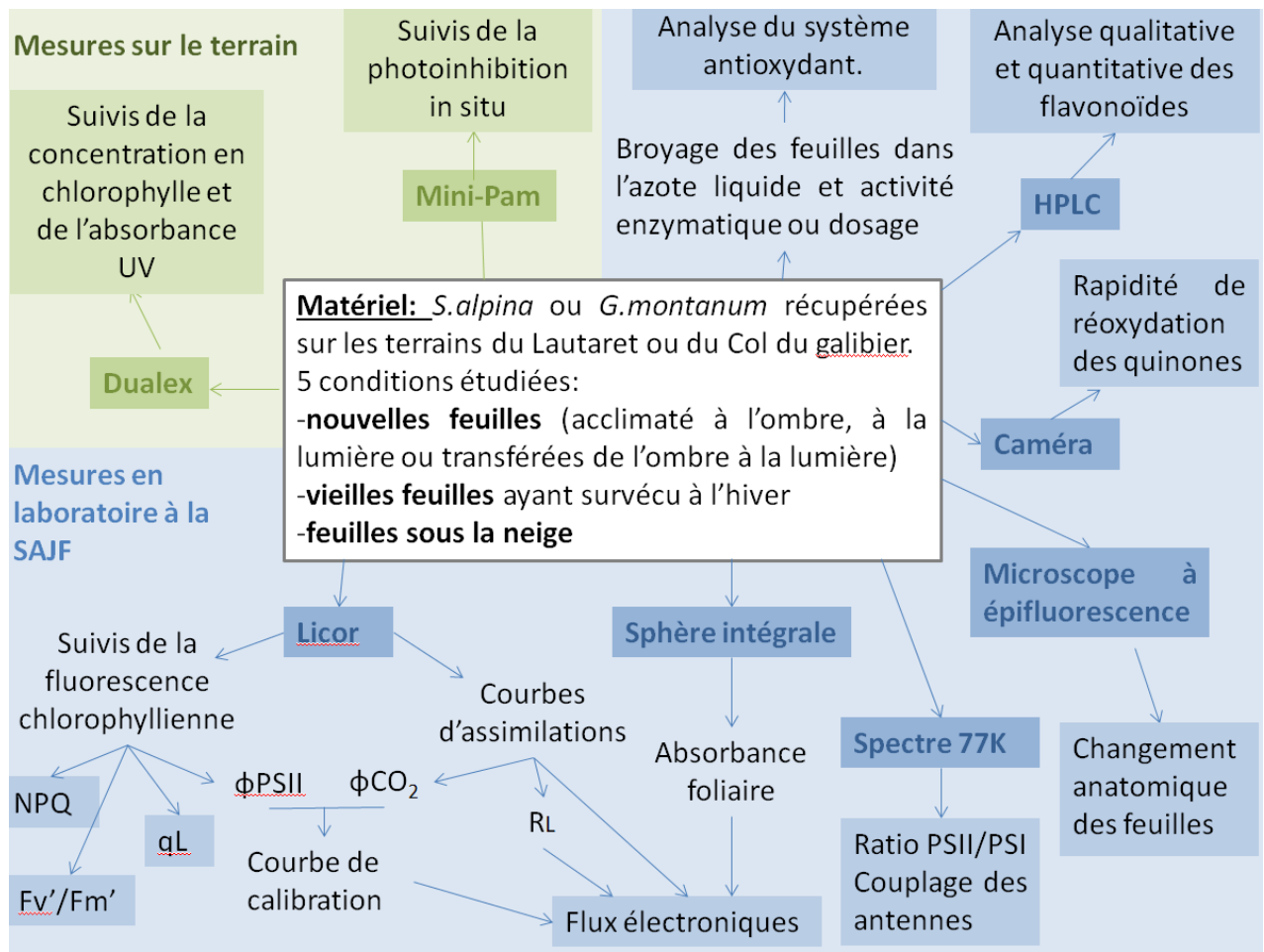


Figure 43: récapitulatif des mesures effectuées dans le cadre de cette thèse. Sont figurées les lieux où ont été faites les mesures, l'information/resultat recherché et l'appareil de mesure utilisé.

Résultats

Chapitre 1:

La capacité de dépistage des UVA épidermiques mesurée in situ est-elle un bon indicateur de l'état d'acclimatation lumineuse des feuilles in situ? Une étude de cas avec la plante alpine très plastique *Soldanella alpina* L.

Abstract

Soldanella alpina differing in leaf UV-A absorbance (DA_{375}) as measured with the Dualex was investigated as a model alpine plant for the flavonoid (Flav) composition and concentration and for anatomical and pigment characteristics. In sun leaves twenty-three flavones were characterised by their mass formula, their maximum absorption, their glycosylation, their methylation and dehydroxylation pattern. The flavones belonged to four subfamilies (tetra-hydroxy-flavones, penta-hydroxyflavones, penta-hydroxy-methyl-flavones and dihydroxy-dimethoxy-flavones), abundant in sun and shade leaves. Their concentration was estimated by their absorption at 350 nm after HPLC separation. Sun leaves contained relatively higher contents of penta-hydroxy-methyl-flavones and shade leaves higher contents of tetra-hydroxy-flavones. The flavones were present in the symplast, mainly in vacuoles, all over the leaf. After shade-sun transfer, the content of most flavones increased, irrespective of the presence or absence of UV radiation. Highly significant correlations with the log-transformed DA_{375} suggest that DA_{375} can be readily applied to predict the flavone content of *S. alpina* leaves. Shade-sun transfer of leaves decreased the hydroxycinnamic acid (HCA) content, the mass-based chlorophyll (Chl) a+b content and the Chl/Carotenoid (Car) ratio but increased DA_{375} , and the Car content. Together with previously reported anatomical characteristics all these parameters correlated significantly with the DA_{375} . The Flav content is therefore correlated to most of the structural characteristics of leaf acclimation to light and this can be probed *in situ* by DA_{375} .

Résumé

Soldanella alpina, dont l'absorbance foliaire aux UV-A (DA_{375}) varie, a été étudiée comme plante alpine modèle pour la composition et la concentration en flavonoïdes (Flav) ainsi que pour les caractéristiques anatomiques et pigmentaires de feuilles. Dans les feuilles des plantes ayant poussé au soleil on a caractérisé vingt-trois flavones par leur formule massique, leur absorption maximale, leur glycosylation, leur profil de méthylation et de déshydroxylation. Les flavones appartenaient à quatre sous-familles (tétra-hydroxy-flavones, penta-hydroxyflavones, penta-hydroxy-méthyl-flavones et dihydroxy-diméthoxy-flavones), abondantes dans les feuilles d'ombre et de soleil. Leur concentration a été estimée par leur absorption à 350 nm après séparation par HPLC. Les feuilles de soleil contenaient des teneurs relativement plus élevées en penta-hydroxy-méthyl-flavones tandis que les feuilles d'ombre avaient des teneurs plus élevées en tétra-hydroxy-flavones. Les flavones étaient présentes dans le symplasma, principalement dans les vacuoles, sur toute la feuille. Après le transfert ombre-soleil, le contenu de la plupart des flavones a augmenté, indépendamment de la présence ou de l'absence de rayonnement UV. Des corrélations très significatives avec le DA_{375} transformé en log suggèrent que DA_{375} peut être facilement appliqué pour prédire la teneur en flavone des feuilles de *S. alpina*. Le transfert de feuilles entre soleil et soleil a diminué la teneur en acide hydroxycinnamique (HCA), la teneur en masse de chlorophylle (Chl) a+b et le rapport Chl / Caroténoïde (Car) mais a augmenté la DA_{375} et la teneur en Car. En prenant également en compte les caractéristiques anatomiques précédemment étudié, tous ces paramètres corrèlent significativement avec DA_{375} . La teneur en Flav est donc corrélée à la plupart des caractéristiques structurelles de l'acclimatation des feuilles à la lumière, ce qui peut être sondé *in situ* par DA_{375} .

Is epidermal UVA screening capacity measured in situ a good indicator of light acclimation state of leaves in situ? A case study with the very plastic alpine *plant Soldanella alpina* L.

Authors:

Luc P.R. Bidel^A, Sylvie Meyer^{BC}, Anne-Claire Talhouet^B, Xavier Baudin^D, Caroline Daniel^B, Guillaume Cazals^E, Peter Streb^B

^A AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France.

^B Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, UMR-CNRS 8079, Bât 362, F-91405 Orsay, France

^C Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475, Paris, France

^D Plate-forme de recherche ImagoSeine, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, INSERM, Université Paris Diderot-Paris7, Bât. Buffon, F-75013 Paris, France

^E Laboratoire de Mesures Physiques, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

* corresponding author:

Tel: (0033) 01 6915 5681; Fax: 01 6915 7238; email: peter.streb@u-psud.fr

luc.bidel@univ-montp2.fr

sylvie.meyer@u-psud.fr

Anne-claire.talhouet@u-psud.fr

xavier.baudin@ijm.fr

caroline.daniel@ips.unibe.ch

guillaume.cazals@umontpellier.fr

Abbreviations : Car : carotenoids, Chl : chlorophyll, Chl-index : chlorophyll optically measured ; DEA₃₂₂, DEA₃₇₅ : epidermal UV absorbance optically measured with the Dualex at 322 nm or 375 nm, Flav : flavonoids, HCA : hydroxycinnamic acids, LMA : leaf mass per area, m/z: mass to charge ratio, UV: ultraviolet

Abstract:

Soldanella alpina differing in leaf epidermal UV-A absorbance (DEA₃₇₅), as measured with the Dualex, was investigated as a model alpine plant for the flavonoid (Flav) composition and concentration and for anatomical and pigment characteristics. In sun leaves, twenty-three flavones were characterised by their mass formula, their maximum absorption, their glycosylation, their methylation and dehydroxylation pattern. The flavones belonged to four subfamilies (tetra-hydroxy-flavones, penta-hydroxy-flavones, penta-hydroxy-methyl-flavones and tri-hydroxy-di-methoxy-flavones), abundant in sun and shade leaves. Their concentration was estimated by their absorption at 350 nm after HPLC separation. Sun leaves contained relatively higher contents of penta-hydroxy-methyl-flavones and shade leaves higher contents of tetra-hydroxy-flavones. The flavones were present mainly in vacuoles, all over the leaf. After shade-sun transfer, the content of most flavones increased, irrespective of the presence or absence of UV radiation. Highly significant correlations with the log-transformed DEA₃₇₅ suggest that DEA₃₇₅ can be readily applied to predict the flavone content of *S. alpina* leaves. Shade-sun transfer of leaves decreased the hydroxycinnamic acid (HCA) content, the mass-based chlorophyll (Chl) a+b content and the Chl/Carotenoid (Car) ratio but increased DEA₃₇₅, and the Car content. Together with previously reported anatomical characteristics all these parameters correlated significantly with the DEA₃₇₅. The Flav content is therefore correlated to most of the structural characteristics of leaf acclimation to light and this can be probed *in situ* by DEA₃₇₅.

Keywords

Dualex, leaf flavonoids, light acclimation, *Soldanella alpina*, epidermal UV absorbance

1. Introduction

Because climate change threatens alpine plants, it becomes urgent to develop the knowledge of their plasticity in response to rapid environmental changes. Since about ten years ago, experiments are conducted each summer on *Soldanella alpina* L. at the Joseph Fournier Alpine Station to better understand its acclimation potential. *Soldanella alpina* plants growing in the alpine life zone belong to the family of the *Primulaceae* from which a rich composition of different flavonoids (Flav) have been described (Harborne, 1968). Total leaf Flav content of plants increases with altitude (Rozema *et al.*, 1997a; Filella and Peñuelas, 1999). Flav synthesis is induced by UV-B radiation and their accumulation in cell walls, vacuoles and trichomes of epidermal cells was shown to attenuate the penetration of UV radiation (Winkel-Shirley, 2002b; Agati *et al.*, 2013). However, also visible light and different stress factors induce Flav synthesis and they were shown to be present in vacuoles and chloroplasts of mesophyll cells. This, as well as the known antioxidant activity of Flav, suggests that Flav accumulation also contribute to antioxidant protection (Agati *et al.*, 2013). Hence, under high sunlight in the mountains, flavonoids could protect photosynthetic cells from UV-induced damage by reducing the UV radiation arriving in the chloroplast and by scavenging of reactive oxygen species formed under such conditions (Agati *et al.*, 2013).

In recent years, portable fluorescence detectors, like the Dualex, allow to estimate epidermal leaf Flav contents *in situ* (Goulas *et al.*, 2004). In *S. alpina*, the Dualex measurements of

epidermal UV-A absorbance at 375 nm (DEA₃₇₅) suggest very high contents of epidermal flavonoids, which contribute to protection of photosystem II from photoinhibition under natural sunlight (Laureau *et al.*, 2015b). The UV filtering capacity of *S. alpina* leaves is very high as compared to most other investigated species (Meyer *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2009; Latouche *et al.*, 2013; Bidel *et al.*, 2015; Klem *et al.*, 2015; Lefebvre *et al.*, 2016) and as compared to several other alpine plant leaves growing at the same site (unpublished results).

However, *S. alpina* leaves with relatively low contents of UV absorbing compounds were also present at shaded growing sites. Similar differences in epidermal UV-A absorbance between shade and sun leaves have been published for various plant species (Krause *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2013). In *S. alpina* leaves, high DEA₃₇₅ in comparison to low DEA₃₇₅ correlated with other characteristics indicating light acclimation as: 1) higher chlorophyll Chl a/b ratio 2) lower Chl/Car ratio 3) higher ascorbate peroxidase activity, 4) higher leaf mass per area (LMA) and leaf thickness, 5) higher stomatal, trichome and adaxial epidermal cell densities (Laureau *et al.*, 2015b). At least for *S. alpina* leaves, DEA₃₇₅ measurements may be suitable to estimate rapidly and non-destructively the relative state of light acclimation of leaves *in situ*.

While UV absorbance and Flav contents vary in several plant species due to daily changing light conditions (Veit *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2016), it was stable in *S. alpina* leaves (Laureau *et al.*, 2015b). DEA₃₇₅ of *S. alpina* leaves did not decline after prolonged transfer of plants to low light intensity in a growth chamber neither during senescence of leaves (Laureau *et al.*, 2015b), confirming observations in *Populus tremuloides* and *Vicia faba* (Barnes *et al.*, 2013) and several tree species (Mattila *et al.*, 2018). In contrast, high epidermal UV absorbance was induced in shade leaves exposed to sunlight, even in the absence of UV radiation (Barnes *et al.*, 2013; Laureau *et al.*, 2015b). Such a lowlight – highlight transfer occurs also in the natural

environment in particular in autumn if the vegetation shading *S. alpina* leaves gets senescent and during grazing by animals. In spring, after snowmelt, all leaves from the previous year have a high DEA₃₇₅, while newly formed leaves of the present year can develop under shade conditions with low DEA₃₇₅ (Laureau *et al.*, 2015b).

The Flav composition and their tissue distribution of *S. alpina* are unknown, as well as changes induced by shade-sun transfer. After sun exposure, the accumulation of Flav is generally accompanied by a decrease in the mass allocated to Chl within the leaf (Meyer *et al.*, 2006). By optically measuring both Chl and epidermal Flav contents, using the Chl meter SPAD or the Dualex 4 Scientific (Cеровic *et al.*, 2015), it is possible to probe this process *in situ* by assessing the Chl to Flav ratio of leaves. In woody plants, like beech, this ratio decreases from shade to sun leaves through the canopy (Meyer *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2012). However, it is unknown to which extent it could probe the short-term plasticity of shade leaves exposed to sun in the field.

S. alpina is an interesting model for this investigation, since it grows at various altitudes, it is already enzymatically and photosynthetically characterised (Laureau *et al.*, 2011; Laureau *et al.*, 2015b) and because the same leaf can experience very low and very high solar radiation during its life cycle in the Alps. Our specific objectives were (i) to investigate the Flav composition and distribution of *S. alpina* leaves, (ii) to analyse changes of the Flav composition induced by sunlight in the presence and absence of UV and their relation to optically assessed epidermal Flav content and (iii) to investigate to which extent optical sensor measurements are correlated to Chl, Car, and to anatomical traits in different light acclimation states of *S. alpina* leaves.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant Material and experimental designs

S. alpina plants growing at 2100 m (45° 02' 12.3'' N 6° 24' 068' E) in the area of the Lautaret and at 2400 m altitude (45° 03' 10.5'' N 6° 24' 20.2'' E) between the Lautaret and the Galibier pass in the French Alps were investigated (Laureau *et al.*, 2015b). Plants at 2100 m altitude were used either from shaded sites covered by the surrounding vegetation or from more sun exposed sites in an area of approximately 30 m². At this altitude plants had fully developed leaves of the present year at the beginning of the experiments. Plants at 2400 m altitude were all sun exposed and investigations started directly after snowmelt in leaves from the previous year. As shown previously (Talhouët *et al.*, 2019), only mature leaves, which did not change their leaf area during the experiment, were used.

Experiments were performed in four consecutive years. In 2015, selected leaves with low or high DEA₃₇₅ values were marked and investigated regularly during 30 days. Leaves covered by the surrounding vegetation were either left under this condition (shade leaves) or the vegetation was cut (shade-sun transferred leaves) and leaves were exposed to sunlight either in the presence or absence of a UV cut-off filter (1 m²; Plexiglas PVCG; Air and Eau Systèmes, Ludres, France; cutoff filter at 400 nm) which absorbs all radiation lower than 400 nm (Laureau *et al.*, 2015b). Shade-sun transferred leaves which were protected by the UV filter were used for the investigation of the individual induced Flav. In all other years and for all other experiments, leaves were only shade-sun transferred in the absence of a UV filter.

2.2. Radiation and temperature measurements

The leaf temperatures were measured with a copper-constantan thermocouple attached to the lower surface of at least 2 independent leaves under each condition and the PFD with a quantum flux sensor (JYP 1000, SDEC France) which was placed in orientation and high to 2 independent representative leaves. The data were recorded with a Campbell data logger (CR23x, Logan, Utah) during the whole investigation period in the reference year 2015 at 2100 m and 2018 at 2400 m. Data were accumulated every 30 s. Hourly mean and maximum photon flux density values are shown in Table 1. UV-A and UV-B radiation were measured with a UV radiometer RM22 (Dr. Göbel, Ettlingen, Germany) for at least 1 h during three sunny cloudless days under the different conditions. Actual maximum values are presented as W cm^{-2} and accumulated values as J h^{-1} (Table 1).

2.3. Optical measurements of epidermal UV absorbance and leaf Chl

The optical measurements of epidermal UV absorbance and leaf Chl followed (Laureau *et al.*, 2015b). Epidermal UV absorbance was measured from both leaf sides of attached leaves with a leaf-clip device (Dualex, Force-A, Orsay, France) as described in Goulas *et al.* (2004). A Flav-Dualex (Dualex® FLAV 3.3) was used to measure absorbance at 375 nm by comparing Chl fluorescence excited at 650 and at 375 nm. The excitation at 375 nm lies in the absorption range of Flav (Goulas *et al.*, 2004). Epidermal absorbance at 322 nm was measured with a HCA-Dualex from the same leaf location as measured with the UV-A Dualex. The HCA-Dualex compares fluorescence yield excited at 650 and at 322 nm and allows estimation of the epidermal hydroxycinnamic acid (HCA) content (Latouche *et al.*, 2013). Since Flav contribute to DEA_{322} , HCA-Dualex measurements were corrected by the estimated Flav content according to Latouche *et al.* (2013). Ten readings from each Dualex were taken, including five

from each leaf side. Results were used to estimate the total Flav and the total HCA content of the leaf epidermis (Goulas *et al.*, 2004).

A Chl content index (Chl-index) was obtained using either the Dualex 4 Scientific (Force-A, Orsay, France) or the SPAD-502 (Konica-Minolta, Tokyo, Japan) according to Cerovic *et al.* (2015). Five readings from the adaxial side were used to estimate the mean Chl content of the leaf. The measured Chl-index values with the Dualex 4 correlated to surface based total Chl content as measured in acetone extracts (Laureau *et al.*, 2011) (Fig. S1) and correlated to SPAD ($\text{Chl-index} = 0.61 \cdot \text{SPAD} + 4.98$, $R^2 = 0.771$, $n = 85$). All measurements were done at the same leaf spots, with five spots per leaf. The ratio between Chl-index and DEA_{375} was calculated from the mean of Chl-index and the total Flav contents of each leaf.

The LMA, the Chl and the Car contents after extraction of leaves in 80 % acetone and subsequent centrifugation, the Chl a/b ratio and the ratio of Chl a+b/Car were determined at the end of the experimental period as described in Laureau *et al.* (2011, 2015).

Biochemical analysis and imaging were done the following days after the experimental period, at the INRA (AGAP, Montpellier) and at an imaging facility (ImagoSeine, institute Jacques Monod, Paris), respectively. Harvested leaves were stored overnight under humidified atmosphere and low temperature conditions before imaging.

2.4. Sample extraction and mass spectrometry characterization of leaf flavonoids

The extraction protocol was derived from Bidet *et al.* (2015). The extraction solvent was composed of methanol/water (70/30, v/v) acidified with 0.1% HCl. The 5-*O*-methoxyflavone, a compound that is very similar to *Soldanella* flavones but not synthesized by this plant

species, was added at a concentration of 500 μM to the extraction solvent, as an internal standard. Results were corrected for the loss of analytical Flav during sample preparation or sample inlet by correcting for the internal standard. For individual leaf lamina analysis, leaves were harvested in their natural environment after Dualex measurements and freeze-dried. Quantification was done on both, a surface basis unit and a dry weight basis.

Leaf metabolites were characterized according to Bidet et al. (2015) using Synapt G2-S high resolution mass spectrometry system (Waters Corp., Milford, MA). Chromatographic separation was performed on C18 column (XTerra MS, 3.5 μm particle size, 2.1 x 100 mm) kept at 40 °C. A binary mobile phase gradient was delivered at a total flow rate of 0.21 mL min^{-1} using a binary HPLC pump (Waters 1525I, Waters, Manchester, UK). De-ionized water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were both acidified with 0.1 % (v/v) formic acid to minimize the ionization of phenolics (around pH 3.0). The elution gradient started at 95:5 (v/v) of A:B, followed by a linear gradient for 20 min to 75:25 of (A:B), and second one for 20 min to 60:40 of (A:B). Including the washing and reconditioning of the column, the total running time was 60 min. They were quantified using a micromass ZQ ESCi multimode ionization mass spectrometer (Micromass Ltd, Manchester, UK) as described by Bidet et al. (2015).

Identification of metabolites was based on their retention times, UV absorbance spectra, m/z ratio value and MS fragmentation pattern. When it was possible, they were compared with commercial standards eluted with the same gradient. The absorbance peak of each Flav was integrated at 350 nm, a wavelength close to their maximum absorbance peak indicated in Table 2.

2.5. UV screening compounds of adaxial and abaxial epidermis and mesophyll

Since *S. alpina* has a thick epidermis covered by a thick cuticle, it is resistant enough for manual removal. The epidermis was sampled under a binocular microscope using a razor blade incision located along the main nervure and scraped off with a thin tweezer. We verified the absence of chlorophyll and carotenoids of the epidermis samples using LC-MS in a positive electrospray mode, indicating that no mesophyll cells were removed with epidermis.

About 25 mm² of abaxial epidermis of fresh individual leaf was removed and immediately extracted in 100 µL of methanol/water (70/30, v/v) acidified with 0.1% HCl. Interveinal mesophyll located immediately beneath the epidermis was then harvested and similarly extracted. Finally, adaxial epidermis adjacent to this zone was extracted. The surface areas of collected tissues were estimated from images taken with a dissecting microscope. To improve disintegration of cell walls, samples were frozen in liquid nitrogen and warmed up three times in the dark, then sonicated at 0°C for 15 min and stored at -20 °C. After thawing and clarification by centrifugation at 18 000 g for 15 min, 20 µL of the supernatant solution was injected into the Rheodyn® loop of the chromatographic system.

For the determination of epicuticular Flav, 5 g of intact freeze-dried leaves were immersed repeatedly three times in 5 mL chloroform by agitation in a glass bottle during 3 min to remove epicuticular waxes of the epidermis, according to the protocols of Lütz and Gülz (1985) and Fukuda et al. (2008). The extraction was repeated three times and the chloroform extracts were combined and evaporated under reduced pressure to obtain a crude wax fraction, which was taken up in methanol and analyzed by high resolution mass spectroscopy. Similar extraction was also carried out using hexane and acetone.

2.6. Reagents and chemicals

The 5-*O*-methoxyflavone was provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Methanol and acetonitrile from Carlo Erba (Val de Reuil, France) were HPLC-grade quality. Formic acid from Merck (Darmstadt, Germany) was of analytical grade quality. De-ionized water was produced using a reverse osmosis Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.7. Fluorescence microscopy

Images of leaf surfaces were taken using an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver.Z1, Zeiss) equipped with a monochrome-cooled sCMOS camera (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu), a colour-cooled CCD camera (Axiocam HRc, Zeiss) and a led (pE-300 white, CoolLED) for fluorescence excitation. Leaf visible fluorescence was imaged using a 330WB80 excitation filter (Omega, Battleboro, USA), a long pass dichroic beam splitter (DCLP400, Omega) and a LP400 emission filter (Omega). Leaf blue fluorescence was imaged using a 330WB80 excitation filter, a long pass dichroic beam splitter (390DRLP02, Omega) and a 450WB80 emission filter (Omega). Cells densities were determined by counting the cells on UV-excited blue and visible fluorescence images obtained by microscopy at 10x magnification (Plan-Neofluar x10 quartz objectives, Zeiss). Trichomes were counted on UV excited visible fluorescence 42-bit colour images, while stomata and ground epidermal cells were counted on UV excited blue fluorescence 12-bit monochrome images (Laureau *et al.*, 2015b). The spatial distribution of UV-A penetration through the adaxial epidermis was

imaged using UV excited blue fluorescence at different depths of focus from the cuticle to the surface of the mesophyll, at x40 magnification (Plan-Apochromatic x40 quartz objectives, Zeiss). Experiments were automated using Zen software (Zen 2 blue edition, Zeiss) and images were processed using Image J 1.45s (National Institutes of Health, USA).

2.8. Data Analysis

Statistical differences were analysed with the softwares R studio (R studio 1.1.419, Inc., USA) and Sigma Plot (Systat Software, Inc., USA). Differences between means were assessed using Student's t-test at the 0.05 significance level. Since more than two different treatments were performed, all treatments were compared in a pairwise fashion. Significant differences were indicated by different letters. In cases where normality was violated, the data were log-transformed. The relationships between optical and biochemical and anatomical parameters were tested by a regression analysis.

3. RESULTS

3.1. Climatic conditions

At 2100 m elevation, during the investigation period, *S. alpina* leaves exposed to sunlight receive, on an average, more than 2.5 times more PFD during the day than shade leaves (Table 1). Plants grown under the UV filter receive $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mean PFD less than plants without filter. The mean day temperature was the lowest in shade conditions and slightly higher under the UV filter compared to sun conditions. The mean night temperature was lower in sun condition than in shade and under UV filter, hence sun plants were exposed to

higher daily thermal amplitude than shade plants and plants under UV filter. Maximum PFD was similar under shade and UV filter conditions but markedly higher in sun plants. UV-A and UV-B radiation maximum and the UV dose were 10 times higher in sun than in shade plants. Plants grown under the UV filter receive also low UV radiation, which was lower than in shade plants. At 2400 m elevation, PFD and UV radiation were the highest and temperatures were similar to sun leaves at 2100 m elevation (Table 1).

Table 1.

Mean and maximum values of Photon Flux Density (PFD) during the day (7-18h), leaf day and night (18-7h) temperature during the investigation period in the year 2015 at 2100 m altitude and during the investigation period in the year 2018 at 2400 m altitude of *S. alpina* leaves. UV-A and UV-B radiation was measured for 60 min at three independent cloudless days. Actual UV radiation was measured as mW cm^{-2} , total UV radiation was calculated as J h^{-1} . Leaves at 2100 m altitude were investigated under shaded conditions under vegetation and exposed conditions in sunlight or sunlight protected by a cut-off UV filter.

		Shade	Sun	Sun+UV Filter	Sun 2400 m
PFD $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	mean	300	800	700	800
	Max	2000	2500	2000	2700
T °C	day 7-18h	17	19.5	20	19.9
T °C	night 18-7h	11	9.5	10.5	9.1
UV-A	mW cm^{-2}	0.193	2.56	0.132	3.3

	J h ⁻¹	1.1	10.22	0.51	11.8
UV-B	mW cm ⁻²	0.011	0.095	0.0085	0.14
	mJ h ⁻¹	43	429	39	541

3.2. Soluble Flav in *S. alpina* leaves

The total Flav profile of *S. alpina* leaves was first investigated in sun leaves collected randomly in the area of the Galibier pass at 2400 m elevation. Hydro-methanolic extracts of the lamina of full sun leaves are extremely rich in Flav. Thirty-two compounds with typical Flav absorbance spectra have been separated using a 70 min chromatographic gradient from which the 23 most abundant Flav were characterized. Peaks were numbered using their elution order (Table 2) and are separated by the estimated Flav subfamily. All Flav were glycosylated with various combinations of hexoses, rhamnoses and glucuronides (Table 2). Eight different tetra-hydroxy-flavones, three penta-hydroxy-flavones, four penta-hydroxy-

Table 2

Single ion record of Flav of *S. alpina* sun leaves after HPLC separation. In total 32 peaks with a typical Flav signature were measured and 23 major Flav were characterised. They are presented in the order of the estimated Flav subfamily and the elution of the peak (P), which was numbered subsequently. The retention time (RT) is shown. The table include the monoisotopic mass to charge ratio (M/C) (m/z), the major and important MS₂ ions (m/z), the proposed Flav formula, the wavelength of the maximum peak absorption in the UV-C, a shoulder in the UV-B and the maximum in the UV-A region in nm and the probable glycosylation.

P	RT	M/C ratio (m/z)	MS ₂ ions (m/z)	Flavonoid formula	UV-C	UV-B	UV-A	Glycosylation
Subfamily : Tetra-Hydroxy-Flavone								
1	28.96	903.2770	741, 757, 611, 595, 449, 287	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	263	305	345.2	di-rhamnose-di-hexose
2	32.38	903.2770	741, 757, 611, 595, 449, 287	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	262	306.5	343	di-rhamnose-di-hexose
3	39.50	903.2770	741, 757, 611, 595, 449, 287	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	262	306	345	di-rhamnose-di-hexose
7	51.26	741.2242	595, 449, 287	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	263	302	344.4	di-rhamnose-hexose
8	52.16	595.1663	449, 287	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	263	305	345	rhamnose-hexose
9	52.97	741.2242	595, 449, 287	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	263	305	344	rhamnose-hexose
11	55.12	595.1663	449, 287	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	263	306.2	345.2	rhamnose-hexose
12	55.70	741.2242	595, 449, 287	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	253	306	348.1	di-rhamnose-hexose
Subfamily : Penta-Hydroxy-Flavone								
4	47.37	611.1612	465, 303	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	253	310	350	rhamnose-hexose
5	49.83	757.2191	627, 611, 465, 303	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	254	309	350	di-rhamnose-hexose
6	50.92	611.1612	465, 303	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	255	304.4	349	rhamnose-hexose

Subfamily : Penta-Hydroxy-Methyl-Flavone								
13	55.89	771.2348	625, 479, 317, 302, 285, 153	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	252	309	350.4	di-rhamnose-hexose
14	56.17	771.2348	625, 479, 317, 302, 285, 153	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	251.4	306.5	351.4	di-rhamnose-hexose
15	56.52	479.119	317	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	249.2	307	347	Hexose
16	56.90	625.1769	479, 317, 302, 285, 153	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	263	306.2	347	rhamnose-hexose
Subfamily :Tri-Hydroxy-Di-Methoxy-Flavone								
10	54.14	683.146	331	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₉	263	304	348	di-glucuronide
17	57.79	507.1139	331	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	265.1	304.2	349.2	Glucuronide
18	59.27	493.1346	331	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	265.2	304.2	333.2	Hexose
19	59.51	859.178	829, 507, 331	C ₃₅ H ₃₈ O ₂₅	266.1	304	326.1	tri-glucoronide
20	60.2	859.1780	829, 507, 331	C ₃₅ H ₃₈ O ₂₅	265	304.2	341.8	tri-glucoronide
21	60.3	493.1346	331	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	269	306.2	333.6	Hexose
22	60.3	859.1780	829, 507, 331	C ₃₅ H ₃₈ O ₂₅	268.8	304	348.6	tri-glucoronide
23	62.44	493.1346	331	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	266.1	303.5	335.8	Hexose

methyl-flavones and eight tri-hydroxy-di-methoxy-flavones were identified (Table 2). The monoisotopic mass-to-charge ratio, the major and important MS₂ ions as well as the proposed formula and their glycosylation are shown in Table 2.

The maximum absorbance wavelength of the most abundant peaks in the UV-A ranged between 347 and 355 nm (Fig. S2). All peaks show an absorption shoulder in the UV-B and another maximum in the UV-C region of the spectrum (Table 2, Fig. S2). The absorbance peak of each Flav was integrated at 350 nm, a wavelength close to their maximum absorbance peak indicated in Table 2 between 20 and 70 min elution. It should be mentioned, that additional eleven compounds with a retention time lower than 28 min contributed to the 350 nm absorption but to less than 1% and were therefore not further analyzed.

3.3. Flav distribution in the leaf

Individual leaves from intact plants were tested for their Flav distribution in the leaf (Fig. S3). Therefore, the adaxial and abaxial epidermis and the mesophyll were extracted separately and analysed by HPLC. All Flav were identified in the abaxial and adaxial epidermis as well as in the mesophyll (Fig. S3) but no Flav were found in cuticular waxes (not shown). To examine to which extent the adaxial epidermis filtered the UV radiation, blue fluorescence images of the epidermis of sun leaves with different focus were recorded (Fig. 1). Blue fluorescence is not emitted by Flav but mainly by HCA and some various other metabolites like phenolamides, several coumarins or

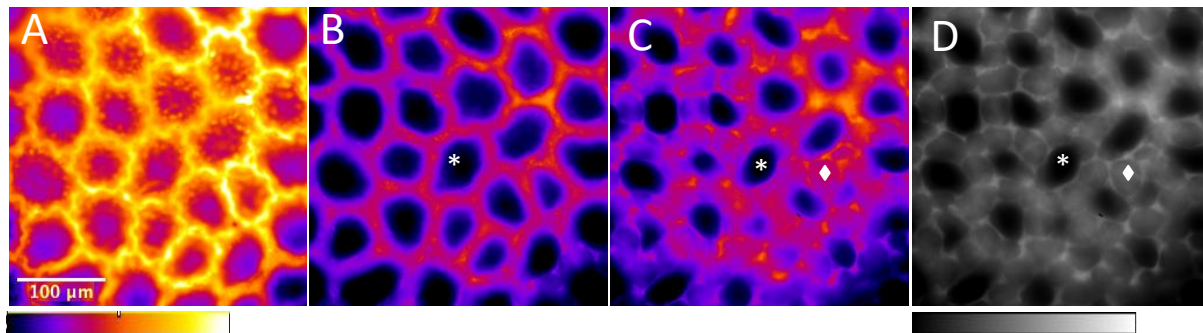


Fig. 1

Fluorescence images of the adaxial surface of a *S. alpina* sun leaves grown at 2100 m altitude with different increasing depth of focus from A through C. The focus was on the top of the epidermis and of the mesophyll in A and C, respectively. Images were obtained with a 3330WB80 excitation filter and a 450WB80 emission filter in order to show the cell outlines, and were taken with a similar exposure time. Image D is the grey image corresponding to C and shows the mesophyll cell delimitation under the epidermis. The three-bits false colour scale (A-C) and the eight-bits grey scales (D) correspond to the relative blue fluorescence intensity from 0 (black) to maximal value (white). The asterisk and the diamond indicate the vacuole of an epidermal cell and a mesophyll cell, respectively.

Each epidermal cell was delimited by a bright fluorescent winding cell wall and the rough cuticle visible on the surface of some cells emitted also a blue fluorescence possibly from HCA (Fig. 1A). The peripheral cytoplasm emitted about 50% less blue fluorescence than the cell wall (Fig. 1A, B) and the central vacuole did not fluoresce (Fig. 1B, C, black area). The mesophyll blue fluorescence could be detected only at the level of anticlinal epidermal cell walls, not at the level of epidermal vacuoles (Fig. 1C, D) and similar pattern were observed using visible fluorescence (not shown), confirming that vacuoles contained non fluorescent UV absorbing compounds like Flav that screened the UV excitation of the mesophyll. Hence, from the spatial distribution of non

fluorescent areas, we deduced that the UV screening was not uniform, depending on the epidermal cell distribution and the vacuoles size. Vacuoles and peripheral cytoplasm covered about 50 and 10% of the imaged area, respectively (Fig. 1B). UVA radiation reached the mesophyll, where blue fluorescence was visible under the epidermal anticlinal cell wall (Fig. 1C, D).

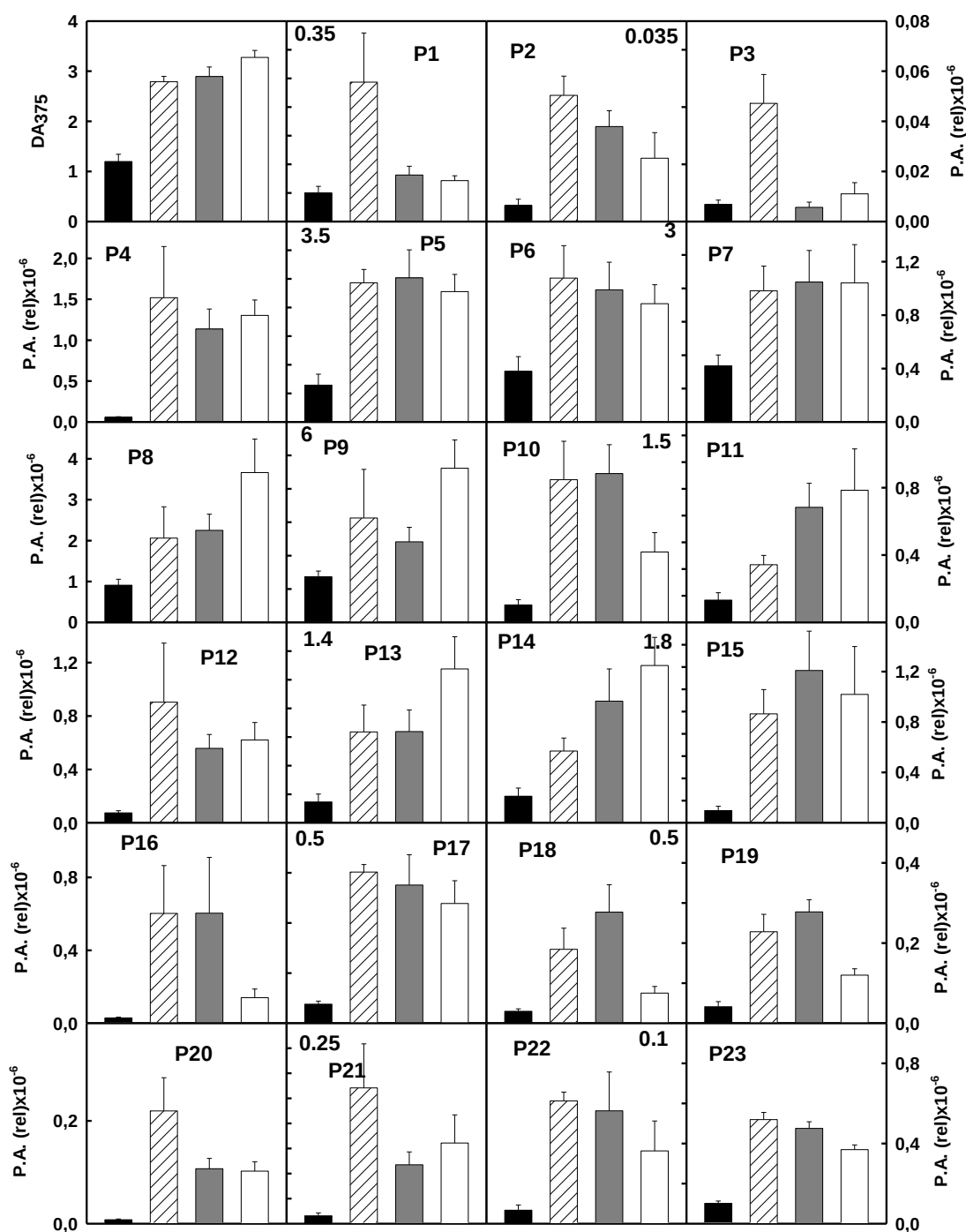


Fig 2

Values of the DA₃₇₅ and of the 23 individual identified Flav (Table 2) in shade (black), sun (white) and shade-sun transferred leaves in the presence of UV radiation (white stripes) and in the absence of UV radiation blocked with an UV filter (grey). The peaks are numbered corresponding to their retention time and are characterized in Table 2. The relative peak area (P.A.) $\times 10^{-6}$ is

shown. The maximum scale is indicated by numbers corresponding to their relative concentration. The statistic difference (p -value) is shown in Table S1.

3.4. Changes of individual Flav after shade-sun transfer

The 23 major Flav were present in sun and shade leaves and analyzed on the same leaf area basis corrected by an internal standard (Fig. 2). The two tetra-hydroxy-flavones with the peak number P8 and P9 and a retention time of 52.1 and 53 min were the most abundant Flav. Their relative content of total 350 nm absorption was 38% in sun and 45% in shade leaves (Fig. 2). Both Flav shared a parent ion at m/z 741 $[M+H]^+$ with a fragment ion at m/z 287 $[M+H]^+$ corresponding to tetra-hydroxy-flavone and a fragmentation pattern, which suggests two isomers containing hexose-di-rhamnose (Table 2). A second group of three penta-hydroxy-flavones peaking between 47 and 51 min (P4, P5 and P6) had a relative content of 350 nm absorption of 26% in sun and 33% in shade leaves. The relative content of a third group of two penta-hydroxy-methyl-flavones (P14 + P15 at 56 min retention time) was 12% in sun leaves but only 6% in shade leaves. All other Flav shared the remaining 24% in sun and 16% in shade leaves. The relative content of tetra-hydroxy-flavones to the total 350 nm absorption was higher in shade than in sun leaves, while the relative content of penta-hydroxy-methyl-flavones was higher in sun than in shade leaves (Fig. 2). The other two Flav subfamilies were similarly distributed in shade and in sun leaves. The total peak area at 350 nm of sun leaves was four times higher than in shade leaves. The peak area of most individual peaks (Fig. 2) was significantly (at least $p = 0.05$) higher in sun than in shade leaves (Table S1). No significant difference was observed in the four tetra-hydroxy-flavones peaks P1-P3 and P7 and in one penta-hydroxy-methyl-flavone (P22) (Table S1).

The 350 nm peak areas of all 23 Flav increased strongly after shade-sun transfer to values similar as in sun leaves (Fig. 2). Some of the shade-sun induced Flav had even higher peak areas

compared to sun leaves. The difference to sun leaves was significant for the Flav with the peak P18, P19 and P23 (Table S1) corresponding to 4% of the total 350 nm peak area in leaves induced in full sunlight and to 6% in leaves induced in the absence of UV radiation. Shade-sun transferred leaves protected by the UV filter had also a significant higher peak area of flavonoid P10 (6% of total 350 nm peak area) and shade-sun transferred leaves in the absence of the UV filter had a significant higher peak area of P3 (0.3% of total 350nm peak area). Flavonoid P3 was only induced in full sunlight (Fig. 2, Table S1). Independent of the treatment, tetra-hydroxy-flavones had the highest total peak area at 350 nm, followed by penta-hydroxy-flavones and penta-hydroxy-methyl-flavones (Fig. 3A). The glycosylation pattern of Flav by rhamnose-hexose and di-rhamnose-hexose were by far prevailing (Fig. 3B). All Flav subfamilies were similarly induced in shade-sun transferred leaves, independent

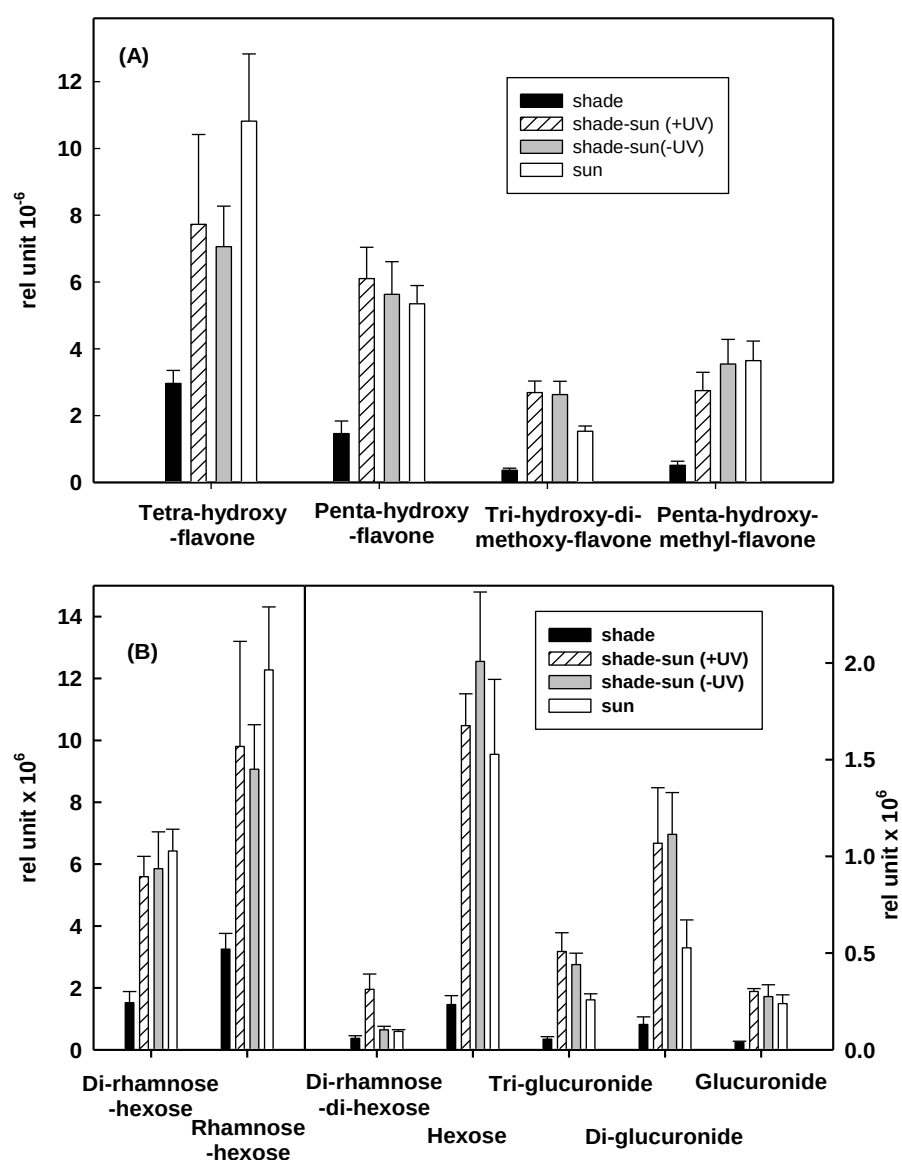


Fig. 3

A: Relative peak area at 350 nm of the four subfamilies of flavonoids grouped together in *S. alpina* shade leaves (black) shade-sun transferred leaves (white stripes) shade-sun transferred leaves protected by a UV filter (grey) and sun leaves (white). The statistic difference (p value) is shown in Table S2

B: Relative peak area of the glycosylation pattern of the flavonoids in *S. alpina* shade leaves (black) shade-sun transferred leaves (white stripes) shade-sun transferred leaves protected by a UV filter (grey) and sun leaves (white). The statistic difference (p value) is shown in Table S3

of the presence of UV radiation. However, the peak area of tri-hydroxy-di-methoxy-flavones at 350 nm was significantly higher than in sun leaves (Fig. 3A, Table S2). Also the glycosylation pattern of the Flav was different in sun-induced and sun leaves. Both, the tri-gluconoride and the di-gluconoride flavones accumulated significantly more in shade-sun transferred leaves in the presence and the absence of UV radiation compared to shade or sun leaves. Furthermore, shade-sun transferred leaves in the presence of UV radiation accumulated significantly the highest content of di-rhamnose-di-hexose glycosides (Fig. 3B Table S3).

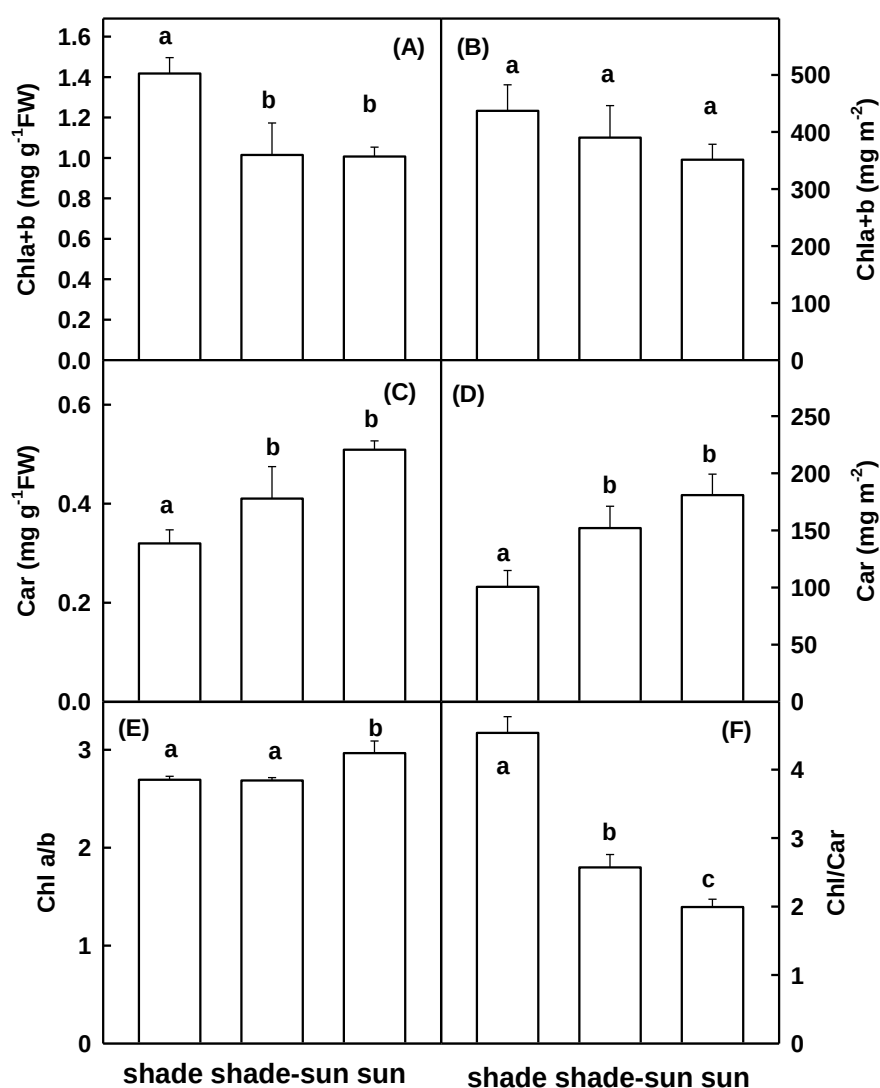


Fig. 4.

Changes of Chl and Car content and Chl a/b and Chl/Car ratios of sun leaves shade leaves and leaves transferred from the shade to the sun after an observation period of 30 days under the respective conditions. Chl and Car contents were measured in leaf extracts and are expressed on a fresh weight and a surface basis. Significant differences at the $P < 0.05$ level is indicated by different letters.

3.5. Changes of epidermal UV absorbance, Chl and Car after shade-sun transfer

Shade-sun transfer also affected other pigments involved in photosynthesis and protection against UV radiation and oxidative stress. In leaf extracts a significant decline of Chl a+b content on a fresh weight basis and a significant increase of Car on a fresh weight and a surface basis were observed (Fig. 4A, C, D). Chl contents also slightly declined on a surface basis, but this was not significant (Fig. 4B). Interestingly, Chla/b ratios remained stable in shade-sun transferred leaves while the ratio was higher in sun than in shade leaves (Fig. 4E). In contrast, the Chl/Car ratio significantly differed between shade and sun leaves and declined significantly in shade-sun transferred leaves (Fig. 4F).

In Fig. 2, changes in DEA_{375} were documented for the same samples used for Flav extraction. However, optical measurements allowed the extension of Flav, HCA and Chl measurements to a much higher sample number and to higher altitude growing sites. Comparing Fig. 5A with Table 1 shows that DEA_{375} strongly depended on the mean PFDs received by the leaves but not on the maximum PFD and saturated at a mean PFD of $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Contrary to DEA_{375} , DEA_{322} decreased from shade to sun conditions (Fig. 5C). A similar trend was measured for the Chl-index (Talhouët *et al.*, 2019), leading to a strong decrease of the Chl-index/ DEA_{375} ratio from shade to sun leaves at 2100 m elevation. The higher Chl-index/ DEA_{375} ratio at 2400 m compared to 2100 m elevation was due to a higher Chl-index at higher altitude (Fig. 5B) and the higher Chl-index/ DEA_{375} ratio in shade-sun transferred leaves in the presence compared to the absence of the UV filter was mainly due to a lower DEA_{375} .

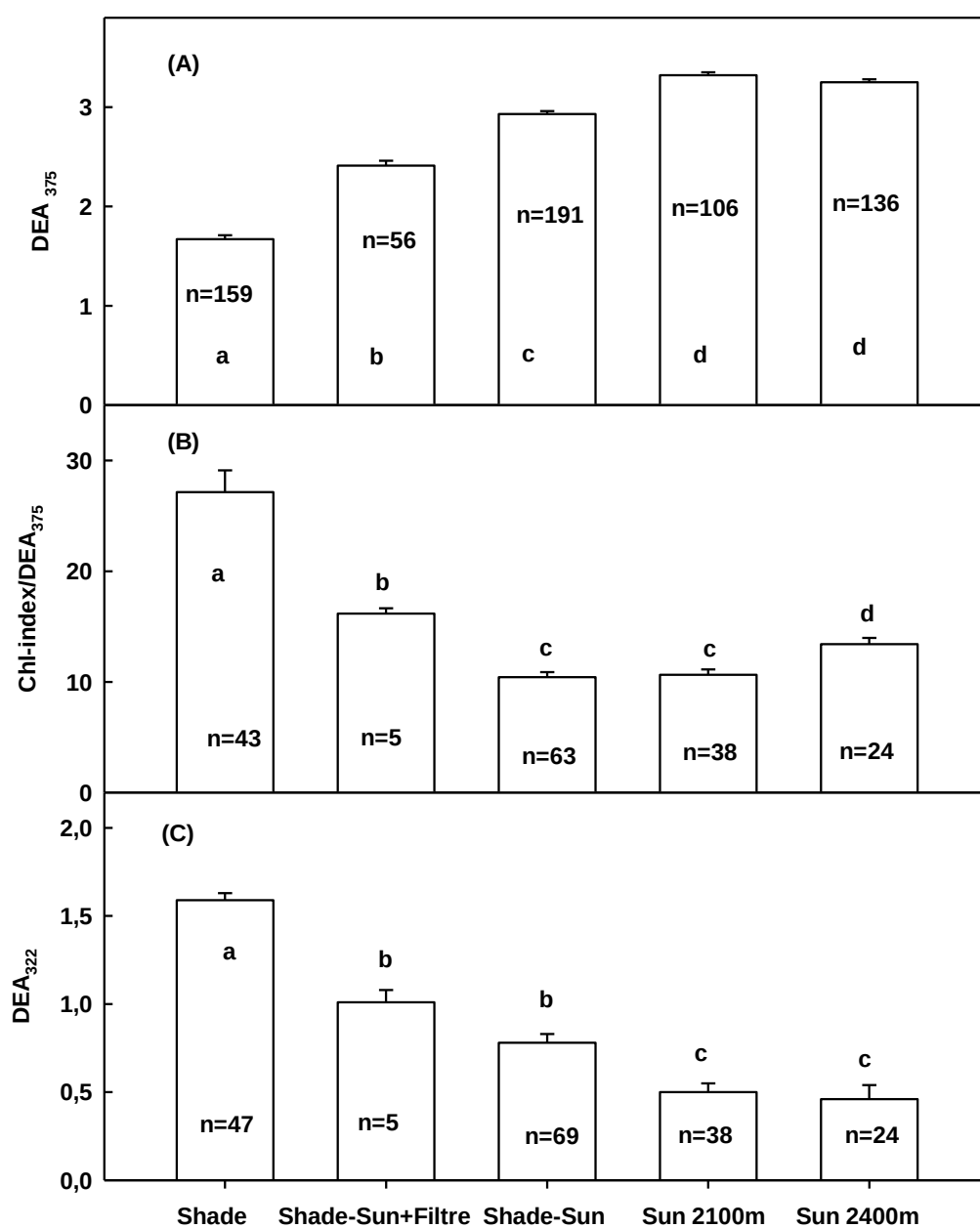


Fig. 5.

Epidermal UV absorption at 375 nm (DEA_{375}), ratio of Chl-index to DEA_{375} and DEA_{322} in *S. alpina* leaves collected at 2100 m from the shade, transferred from shade to sun in the presence and absence of a UV filter, from the sun and from the sun at 2400 m elevation. DA_{322} has been corrected according to Material and methods. Measurements on individual plants were

performed at the end of the experimental period (end July or the beginning of August). Significant differences at the $p < 0.05$ level is indicated by different letters.

Table 3

Correlation coefficients and significance of the relationships between the total DEA₃₇₅ and the area based Flav content from HPLC analysis of *S. alpina* leaves from different growth conditions at 2100 m and 2400 m altitude and from different light and UV exposures. Data (of peak area or/and of DEA₃₇₅) were log transformed. THF, Tetra-hydroxy-flavone; PHF, Penta-hydroxy-flavone; THDMF, Tri-hydroxy-di-méthoxy-flavone; PHMF, Penta-hydroxy-methoxy-flavones. The number of leaves (n) used for the correlation is indicated. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s., non significant.

Flav	Flav skeleton	Glycosylation	r	n
P1	THF	di-rhamnose-di-hexose	0.750***	22
P2	THF	di-rhamnose-di-hexose	0.637*	20
P3	THF	di-rhamnose-di-hexose	0.028ns	21
P4	PHF	hexose-rhamnose	0.884***	22
P5	PHF	hexose-di-rhamnose	0.893***	22
P6	PHF	hexose-rhamnose	0.818***	22
P7	THF	hexose-di-rhamnose	0.339ns	22
P8	THF	rhamnose-hexose	0.719***	22
P9	THF	hexose-di-rhamnose	0.612*	22

P10	THDMF	di-glucuronide	0.750***	22
P11	THF	rhamnose-hexose	0.806***	22
P12	THF	hexose-di-rhamnose	0.910***	22
P13	PHMF	hexose-di-rhamnose	0.804***	22
P14	PHMF	hexose-di-rhamnose	0.900***	22
P15	PHMF	Hexose	0.736***	22
P16	PHMF	hexose-rhamnose	0.497ns	22
P17	THDMF	Glucuronide	0.736***	22
P18	THDMF	Hexose	0.625*	22
P19	THDMF	tri-glucuronide	0.731**	22
P20	THDMF	tri-glucuronide	0.819***	22
P21	THDMF	Hexose	0.655***	22
P22	THDMF	tri-glucuronide	0.602*	22
P23	THDMF	Hexose	0.910***	22

3.6. Correlation between optical, biochemical and anatomical measurements related to leaf acclimation to light

The strong dependence of optical DEA₃₇₅ and DEA₃₂₂ on mean PFD (Fig. 5) allows investigating to which extent optical measurements correlate to individual Flav, photosynthetic pigments and to anatomical traits and are representative for light acclimation. Not surprisingly most of the log transformed peak area of the 23 individual Flav correlated highly significantly to DEA₃₇₅ (Table 3). Therefore, UV-A absorbance was ascribed to a mixture of different Flav. No significant correlation was observed for P3, which were exclusively induced in shade-sun transferred leaves in the

presence of UV radiation and for P7, which was not significantly different in shade and sun leaves (Table S1).

Although total Chl a+b contents on a fresh weight basis as measured in leaf extracts was lower in sun and shade-sun transferred leaves compared to shade leaves, no significant correlation between DEA_{375} and either the Chl a+b content or the Chl a/b ratio was found. DEA_{375} positively and significantly correlated with Car contents on a surface and mass basis as well as with a decrease of the Chl/Car ratio and with the increase of LMA (Table 4, Fig S4).

Highly significant correlations were also observed between the abaxial DEA_{375} and the stomatal and abaxial trichome densities. Consequently, abaxial trichome density correlated also to stomatal density, as well as adaxial epidermal ground cell density. However, no clear difference between shade, shade-sun transferred and sun leaves were observed (not shown). In contrast, the stomatal density was negatively correlated to the abaxial DEA_{322} .

Table 4.

Correlation coefficients (r^2) and significance levels between optical, biochemical and anatomical measurements. The regression equation is shown as $y = a \cdot x + b$ and correlation graphs are shown in Fig. S4. The relationships between optical measurements of total DEA_{375} was correlated to biochemical measurements of Chl a+b (mg g^{-1} FW) and Car (mg g^{-1} FW and mg m^{-2}) and the Chla+b/Car ratio and to LMA (g m^{-2}). Abaxial or adaxial DEA_{375} and DEA_{322} were correlated to the anatomical determined stomatal and trichome densities. Anatomical determinations of the adaxial trichome density and the abaxial ground cell density were correlated to the stomatal density. Chl-index was correlated to LMA and the mass-based Chl-index (Chl index/LMA) to the stomatal

density. After logarithmic transformation, the mass based Chl-index (Chl index/LMA), the mass-based DEA₃₇₅ measurement (DEA₃₇₅/LMA) and the Chl-index to the DEA₃₇₅ ratio (Chl-index/DEA₃₇₅) were correlated to LMA. The number of leaves used (n) is indicated. DEA₃₂₂ was corrected according to material and methods. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; n.s., non significant.

Relationship	r^2	a	b	n
DEA ₃₇₅ vs Chl a+b (mg g ⁻¹ FW)	0.043 ^{ns}	-0.095	1.34	36
DEA ₃₇₅ vs Car (mg g ⁻¹ FW)	0.427 ^{***}	0.097	0.08	36
DEA ₃₇₅ vs Car (mg m ⁻²)	0.509 ^{***}	33.5	10.3	36
DEA ₃₇₅ vs Chl a/b	0.113 ^{ns}	0.136	2.29	36
DEA ₃₇₅ vs Chl/Car	-0.425 ^{***}	1.11	6.40	36
DEA ₃₇₅ vs LMA	0.599 ^{***}	5.49	-0.14	103
Abaxial DEA ₃₇₅ vs stomatal density	0.325 ^{***}	0.067	-0.071	53
Abaxial DEA ₃₂₂ vs stomatal density	0.126 ^{**}	-0.0024	0.95	53
Abaxial DEA ₃₇₅ vs abaxial trichome density	0.189 ^{**}	0.053	0.62	53
Abaxial trichome density vs stomatal density	0.412 ^{***}	0.069	-3.51	53
Adaxial epidermal ground cell density vs stomatal density	0.404 ^{***}	1.26	86.8	53
Chl-index vs LMA	0.021 ^{ns}	-0.139	43.8	103
Chl-index/LMA vs stomatal density	0.034 ^{ns}	-0.0014	1.15	53
log(Chl-index/LMA) vs log(LMA)	0.576 ^{***}	-1.13	1.77	103
log(DEA ₃₇₅ /LMA) vs log(LMA)	0.127 ^{***}	0.321	-1.68	103
Chl-index/DEA ₃₇₅ vs log(LMA)	0.367 ^{***}	-61.3	112.6	103

The Chl-index did not linearly correlate to LMA nor to the stomatal density. The increase of LMA as a function of light received by the leaf was greatly larger than that of the Chl-index because the mass-based Chl content, expressed as Chl-index/LMA, decreased according to a curvilinear relationship. After a logarithmic transformation, Chl-index/LMA and LMA were linearly and negatively correlated while the logarithmic transferred ratio of DEA_{375}/LMA against LMA correlated positively. Consequently, the Chl-index/ DEA_{375} ratio highly and negatively correlated to LMA (Table 4, Fig S4). In shade leaves, this ratio sharply decreased as LMA increased due to a decrease in Chl-index and an increase in DEA_{375} values (Fig. S5A). Therefore shade leaves were in a heterogeneous state of acclimation to light climate, suggesting more or less deep shade conditions in the field. By contrast, in sun acclimated leaves, from all the experiments (Fig. S5A), as from a representative plants (Fig S5B), the leaf acclimation state to light expressed by the Chl-index/ DEA_{375} ratio was more uniform, with higher and more steady mass allocation to Flav than in shade leaves.

4. Discussion

4.1. Flav composition in *S. alpina* leaves

Soldanella alpina is a case study of an alpine species for investigating the biochemical and anatomical leaf plasticity in response to varying solar radiation in the field. Plants growing in the sun received on average 2.6 times higher PFD but approximately 10 times higher UV-A and UV-B radiation than shade plants. In this and previous studies, it was shown that *S. alpina* leaves increase the epidermal UV absorbance in response to the light condition and this increase was

explained with the accumulation of Flav (Laureau *et al.*, 2015b; Talhouët *et al.*, 2019) as described from various other plant species (Kolb *et al.*, 2001; Bidel *et al.*, 2007; Klem *et al.*, 2015; Siipola *et al.*, 2015; Barnes *et al.*, 2016; Zivcak *et al.*, 2017). Mass spectrometry and absorbance analysis of *S. alpina* sun leaves after HPLC separation indicated the presence of up to 32 different Flav and several minor compounds absorbing in the 350 nm range. The identification of these Flav was out of the scope of the present study and requires the availability of a huge number of leaves for further NMR analysis. However, we could divide them into four flavone subfamilies depending on their hydroxylation degree, their methoxylations and esterifications to glycosides from which Harbone (1968) postulated tri-hydroxy-flavones to be present in the *Primulaceae* family. Two penta-hydroxy-flavones absorb up to 45% of the radiation at 350 nm and were present in sun and shade leaves. In conclusion, the extremely high epidermal UV-A absorbance of *S. alpina* leaves results from a mixture of different Flav.

All these Flav were found across the leaf, in epidermal and mesophyll cells but not in the cuticular waxes (Fig. S3). Such a Flav distribution is typical for sun acclimated plant leaves (Agati *et al.*, 2013) and epicuticular Flav are not found in several different genera (Tomás-Barberán and Wollenweber, 1990). None of the flavones were specific for the abaxial or adaxial leaf side or the mesophyll. Epidermal glycosylated Flav absorb most of the UV-A radiation. In *S. alpina*, they were mainly localised in the vacuole confirming the pattern known in mountain herbaceous dicots species (Day, 1993). However, UV-A was not completely blocked at the anticlinal cell walls of the epidermis and thus penetrate to the upper mesophyll surface where it could be absorbed by the mesophyll Flav (Fig 1).

4.2. Flav induction after shade-sun transfer

From the total Flav measured, 23 were abundant in shade and sun leaves and their induction after shade-sun transfer in the presence and absence of UV radiation was monitored semi quantitatively by their absorption at 350 nm after HPLC separation. As reported earlier, the presence of UV radiation was not required to increase DEA₃₇₅ in *S. alpina* leaves although UV radiation amplifies the effect (Laureau *et al.*, 2015b). Similar results were described for other species by Barnes *et al.* (2013, 2016) and Klem *et al.* (2015). Siipola *et al.* (2015) presented evidence that blue visible light was even more effective in inducing Flav accumulation in pea leaves than UV radiation. In several other species, UV-B radiation was specific in inducing flavonoid dependent UV screening of leaves (Kolb *et al.*, 2001; Latouche *et al.*, 2013; Bidel *et al.*, 2015; Vidović *et al.*, 2015). While most Flav accumulated equally in the presence and absence of UV radiation and remained localised in vacuoles (not shown), some distinct differences were observed. Remarkably, P3 accumulated only in shade-sun transferred leaves in the presence of UV radiation, but its contribution to UV-A absorption was negligible (Fig. 2). Furthermore, leaves accumulated significantly more tri-hydroxy-di-methoxy-flavones after shade-sun transfer than sun leaves (Fig. 3A). This suggests that higher hydroxylation of Flav is either limited by enzymatic hydroxylation and requires prolonged sun exposure, or that higher hydroxylation is limited by antioxidant activity of the Flav leading to breakdown products. Increased hydroxylation is generally correlated to a higher antioxidant potential (Winkel-Shirley, 2002a; D'Amelia *et al.*, 2018). In accord, sun leaves with higher oxidative pressure had higher relative contents of penta-hydroxy-methyl-flavones while in shade leaves tetra-hydroxy-flavones were more abundant (Fig. 3A). In *Phillyrea latifolia*, sun and shade leaves differed in flavonoid concentration but not in composition (Tattini *et al.*, 2000). Interestingly, shade-sun transferred leaves increased also their activity of the antioxidant enzyme ascorbate peroxidase (Talhouët *et al.*, 2019), while the content

of ascorbate remained similar in shade and sun leaves (Streb, unpublished results), suggesting that increased Flav contents contribute to antioxidative protection in *S. alpina*.

In addition, the glycosylation pattern of the Flav depended on the light condition in shade-sun transferred leaves. Flav glycosylated with di-rhamnose-di-hexose only accumulated in the presence of UV radiation (Fig. 3B). Shade-sun transferred leaves have a lower photosynthetic activity compared to shade and sun leaves, increased photoinhibition and show indications of oxidative stress (Laureau *et al.*, 2015b; Talhouët *et al.*, 2019). Carbon assimilation limited the photosynthetic activity in shade-sun transferred leaves (Talhouët *et al.*, 2019). If sinks for assimilated carbon are limiting, this can increase the leaf sugar content and reduce carbon assimilation (Paul and Foyer, 2001). In this context, Flav with di-rhamnose-di-hexose in shade-sun transferred leaves in the presence of UV radiation may act as a possible sink for accumulating leaf sugars. Furthermore, sugars can act as antioxidants (Keunen *et al.*, 2013) leading to sugar oxidation and possibly glucuronide accumulation. Again, shade-sun transferred leaves accumulated more flavones with tri- and di-glucuronides compared to sun and shade leaves, supporting further the possibility that Flav synthesis may also act as a sink for excess sugar acids in the leaf.

4.3. Shade-sun induced changes of Chl, Car and of DA₃₂₂

Shade-sun transfer affected also photosynthetic pigments and the epidermal HCA content. The epidermal HCA content decreased after shade-sun transfer opposite to the Flav content and was lowest in *S. alpina* sun leaves (Fig. 5; (Laureau *et al.*, 2015b)). Although no specific HCA could be identified after HPLC separation, DEA₃₂₂ and blue fluorescence of the cuticle, the cell wall and the

trichomes suggest the presence of esterified or etherified HCA in *S. alpina* leaves (Bidel *et al.*, 2015; Laureau *et al.*, 2015b). Furthermore, HCA are widespread metabolites in the *Primulaceae* family (Harborne, 1968). Flavones are synthesised from products of the phenylpropanoid and malonic acid pathway with the intermediate HCA (Winkel-Shirley, 2002a). The negative correlation between epidermal HCA and Flav contents (Fig. 5) suggests that sun conditions stimulate preferentially the synthesis of flavones downstream of HCA than HCA synthesis itself as also observed by Bidel *et al.* (2007) in different woody species.

Shade-sun transfer of *S. alpina* leaves decrease their Chl a+b content as estimated from leaf extracts (Fig. 4) and by optical measurements (Talhouët *et al.*, 2019). Similar results were described in high-light transferred shade leaves of rice, *Chenopodium album* and *Plectranthus coleoides* (Oguchi *et al.*, 2003; Murchie *et al.*, 2005; Vidović *et al.*, 2015). This together with Flav accumulation, decrease the Chl-index/DEA₃₇₅ ratio in *S. alpina*, which was a typical signature of sun compared to shade leaves, indicating carbon allocation to Flav instead to Chl and holds true for various species (Meyer *et al.*, 2006). While the Chl a/b ratio did not acclimate to higher light conditions in shade-sun transferred *S. alpina* leaves, similar to photosynthetic activity (Talhouët *et al.*, 2019) the Car content increased markedly (Fig. 4). Similar observations were reported by Klem *et al.* (2015) in barley varieties. Since Car and Flav are involved in antioxidative protection (Young, 1991; Agati and Tattini, 2010; Agati *et al.*, 2013), their accumulation further indicates increased oxidative stress. In accord, shade-sun transferred leaves are more vulnerable to PSII photoinhibition and leaves have higher mortality than sun or shade leaves (Talhouët *et al.*, 2019).

4.4. Epidermal UV absorbance as an indicator of light acclimation

With the exception of P3 and P7, all other Flav correlated highly significantly with the log-transferred total DEA₃₇₅ (Table 4, Fig S4), showing that not a single or some but nearly the whole Flav signature contribute to epidermal UV-A absorbance in *S. alpina* leaves and acclimate to a change in sunlight intensity.

S. alpina shade and sun leaves as well as shade-sun transferred leaves in the presence and absence of UV radiation represent different states of light acclimation, influenced by the mean PFD received by the leaf. This affects LMA, leaf thickness, stomatal density, Chl and Car mass based contents and the Chl/Car ratio (Laureau *et al.*, 2015b; Talhouët *et al.*, 2019) as generally reported (Lambers *et al.*, 1998). DEA₃₇₅ is correlated to each of these variables and therefore provides a signature of the leaf acclimation to light. In addition, correlation between the Chl-index/DEA₃₇₅ ratio and LMA was similar to those of tree leaves from various light acclimation states (Meyer *et al.* 2006). Sun leaves have a lower Chl-index/DEA₃₇₅ ratio and a higher LMA than shade leaves. In *S. alpina*, each leaf of a given shade plant could acclimate to the sun and reach a similar low Chl-index/DEA₃₇₅ ratio (Fig. S4). Therefore the acclimation of one leaf estimated by Chl-index/DEA₃₇₅ is representative of that of others in *S. alpina*, which could simplify routine monitoring in the field. Consequently, on the whole, leaf Flav content assessed by DEA₃₇₅ should be included as a general characteristic of the leaf light acclimation process.

In *S. alpina* leaves, the Chl a/b ratio did not increase in response to shade-sun transfer and therefore did not correlate to DEA₃₇₅ (Fig. 4; Table 4). The ability to change the Chl a/b ratio after changing the light intensity seems to be species dependent. Increasing Chl a/b ratio were described in low-high light transferred leaves of rice and *Chenopodium album* (Oguchi *et al.*, 2003; Murchie *et al.*, 2005) but not in variegated *Plectranthus coleoides* (Vidović *et al.*, 2015).

In conclusion, rapid optical measurements *in situ* with DEA₃₇₅ and the Chl-index can be used as indicators of structural and pigments components of light acclimation as well as of Flav contents. However, they cannot indicate the functional acclimation state of photosynthetic reactions (Talhouët *et al.*, 2019) due to shade-light induced oxidative stress and damage. Optical assessments of Flav and Chl should then be associated to non-invasive gas exchange and Chl fluorescence measurements to provide a complete picture of the leaf light acclimation *in situ*.

Authors contributions

SM LB and PS designed the experiments and contribute to write the manuscript. All authors participate on measuring, data sampling and calculation of the results.

Acknowledgments

We thank the Station alpine du Lautaret, for providing laboratory facilities and a wonderful atmosphere, Force-A (Orsay) and Z.G. Cerovic and G. Latouche (ESE, Orsay) to make experiments with Dualex possible and the ImagoSeine platform (IJM, Univ. Paris Diderot-Paris 7) for providing the microscope and the stereomicroscope.

References

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M. 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 35-45.

- Barberan, F.A., Wollenweber, E. 1990. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Labiatae* species. *Pl. Syst. Evol.* 173, 109-118.
- Barnes, P.W., Kersting, A.R., Flint, S.D., Beyschlag, W., Ryel, R.J. 2013. Adjustements in epidermal UV-transmittance of leaves in sun-shade transitions. *Physiol. Plant.* 148, 200-213.
- Barnes, P.W., Tobler, M.A., Keefover-Ring, K., Flint, S.D., Barkley, A.E., Ryel, R.J., Lindroth, R.L. 2016. Rapid modulation of ultraviolet shielding in plants is influenced by solar ultraviolet radiation and linked to alterations in flavonoids. *Plant Cell Environ.* 39, 222-230
- Bidel, L.P.R., Chomicki, G., Bonini, F., Mondolot, L., Soule, J., Coumans, M., La Fisca, P., Baissac, Y., Petit, V., Loiseau, A., Cerovic, Z.G., Gould, K.S., Jay-Allemand, C. 2015. Dynamics of flavonol accumulation in leaf tissues under different UV-B regimes in *Centella asiatica* (Apiaceae). *Planta* 242, 545-559.
- Bidel, L.P.R., Meyer, S., Goulas, Y., Cadot, Y., Cerovic, Z.G. 2007. Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: *In vivo* qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 88, 163-179.
- Cerovic, Z.G., Samson G., Morales F., Tremblay N., Moya I. (1999) Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospect. *Agronomie: Agriculture and Environment* 19, 543-578.
- Cerovic, Z.C., Ben Ghazlen, N., Milhade, C., Obert, M., Debuissou, S., Le Moigne, M. 2015. Nondestructive Diagnostic test for nitrogen nutrition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) base on Dualex leaf-clip measurements in the field. *J Agric Food Chem* 63, 3669-3680.
- D'Amelia, V.D., Aversano, R., Chiaiese, P., Carputo, D. 2018. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem. Rev.* 17, 611-625.
- Day, T.A. 1993. Relative UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* 95, 542-550.
- Filella, I., Penuelas, J. 1999. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *Quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecol.* 145, 157-165.
- Fukuda, S. Satoh, A., Kasahara, H., Matsuyama, H., Takeuchi, Y. 2008. Effects of ultraviolet-B irradiation on the cuticular wax of cucumber (*Curcumis sativus*) cotyledons. *J. Plant Res.* 121, 179-189.
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., Moya, I. 2004. Dualex : a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl. Optics* 43, 4488-4496.

- Harborne, J.B. 1968. Comparative biochemistry of the flavonoids – VII. Correlations between flavonoid pigmentation and systematics in the family *Primulaceae*. *Phytochem.* 7, 1215-1230.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., van den Ende, W., Cuypers, A. 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant Cell Environ.* 36, 1242-1255.
- Klem, K., Holub, P., Storch, M., Nezval, J., Spunda, V., Triska, J., Jansen, M.A.K., Robson, T.M., Urban, O. 2015. Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiol. Biochem.* 93, 74-83.
- Kolb, C.A., Käser, M.A., Kopecky, J., Zotz, G., Riederer, M., Pfündel, E.E. 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol.* 127, 863-875.
- Krause, G.H., Gallé, A., Gademann, R., Winter, K. 2003. Capacity of protection against ultraviolet radiation in sun and shade leaves tropical forest plants. *Funct. Plant Biol.* 30, 533-542.
- Lambers, H., Chapin, S.F., Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer, Berlin
- Latouche, G., Bellow, S., Poutaraud, A., Meyer, S., Cerovic, Z.G. 2013. Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. *Planta* 237, 351-361.
- Laureau, C., Bligny, R., Streb, P. 2011. The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Physiol. Plant.* 143, 246-260.
- Laureau, C., Meyer, S., Baudin, X., Huignard, C., Streb, P. 2015. *In vivo* epidermal UV-A absorbance is induced by sunlight and protects *Soldanella alpina* leaves from photoinhibition. *Funct. Plant Biol.* 42, 599-608.
- Lefebvre, T., Millery-Vigues, A., Gallet, C. 2016. Does leaf optical absorbance reflect the polyphenol content of alpine plants along an elevational gradient? *Alp. Bot.* 126, 177-185.
- Louis, J., Meyer, S., Maunoury-Danger, F., Fresneau, C., Meuddec, E., Cerovic, Z.G. 2009. Seasonally changes in optically assessed epidermal phenolic compounds and chlorophyll contents in leaves of sessile oak (*Quercus petraea*): towards signatures of phenological stage. *Funct. Plant Biol.* 36, 732-741.
- Louis, J., Genet, H., Meyer, S., Soudani, K., Montpied, P., Legout, A., Dreyer, E., Cerovic, Z.G., Dufrêne, E. 2012. Tree age-related effects on sun acclimated leaves in a chronosequence of beech (*Fagus sylvatica*) stands. *Funct. Plant Biol.* 39, 323-331.
- Lütz, C. and Gülz, P.-G. 1985. Comparative analysis of epicuticular waxes from some high alpine plant species. *Z. Naturforsch.* 40c, 599-605.

- Mattila, H, Valev, D., Havurine, V., Khoribrykh, S., Virtaene, O., Antinluoma, M., Mishra, K. B., Tyystärvi, E. 2018 Degradation of chlorophyll and synthesis of flavonols during autumn senescence-the story told by individual leaves. *AoB PLANTS* 10: ply028.
- Meyer, S, Cerovic, ZG, Goulas, Y, Montpied, P, Desmotes-Mainard, S, Bidel, L, Moya, I, Dreyer, E 2006. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll content and the dry mass per leaf area ratio of woody plants: a signature of the carbon and nitrogen balance within leaf? *Plant Cell Environ.* 29, 1338–1348.
- Murchie, E.H., Hubbart, S., Peng, S., Horton, P. 2005. Acclimation of photosynthesis to high irradiance in rice: gene expression and interactions with leaf development. *J. Exp. Bot.* 56, 449-460.
- Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T. 2003. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? *Plant Cell Environ.* 26, 505-512.
- Paul, M.J., Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52, 1383-1400.
- Rozema, J., Chardonens, A., Tosserams, M., Hafkenscheid, R., Bruijnzeel, S. 1997. Leaf thickness and UV-B absorbing pigments of plants in relation to an elevational gradient along the Blue mountains, Jamaica. *Plant Ecol.* 128, 151-159.
- Siipola, S.M., Kotilainen, T., Sipari, N., Morales, L.O., Lindfors, A.V., Robson, T.M., Aphalo, P.J. 2015. Epidermal UV-A absorbance and whole-leaf flavonoid composition in pea respond more to solar blue light than to solar UV radiation. *Plant Cell Environ.* 38, 941-952.
- Talhouët, A.C., Meyer, S., Baudin, X., Streb, P. Dynamic acclimation to sunlight in an alpine plant, *Soldanella alpina* L. *Physiol. Plant.* DOI: 10.1111/ppl.12982, in press.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., Romani, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytol.* 148, 69-77.
- Veit, M., Bilger, W., Mühlbauer, T., Brummet, W., Winter, K. 1996. Diurnal changes in flavonoids. *J. Plant Physiol.* 148, 478-482.
- Vidovic, M., Morina, F., Milic, S., Zechmann, B., Albert, A., Winkler, J.B., Jovanovic, S.V. 2015. Ultraviolet-B component of sunlight stimulates photosynthesis and flavonoid accumulation in variegated *Plectranthus coleoides* leaves depending on background light. *Plant Cell Environ.* 38, 968-879.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoid and effect of stress. *Curr. Opin Plant Biol.* 5: 218-223.
- Young, A.J. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plant.* 83, 702-708.
- Zivcak, M., Brückova, K., Sytar, O., Brestic, M., Olsovska, K., Allakhverdiev, S.I., 2017. Lettuce flavonoids screening and phenotyping by chlorophyll fluorescence excitation ratio. *Planta* 245, 1215-1229.

Supplemented Figures and Tables:

Fig. S1

Correlation of Chl-index values as measured with the Dualex 4 and the Chl a+b concentration in mg m^{-2} as measured in acetone extracts in randomly collected *S. alpina* leaves from all experimental conditions. The regression is significant at $P < 0.001$. $\text{Chl-index} = 0.067 \times \text{Chl (mg m}^{-2}) + 9.2$, $r^2 = 0.52$

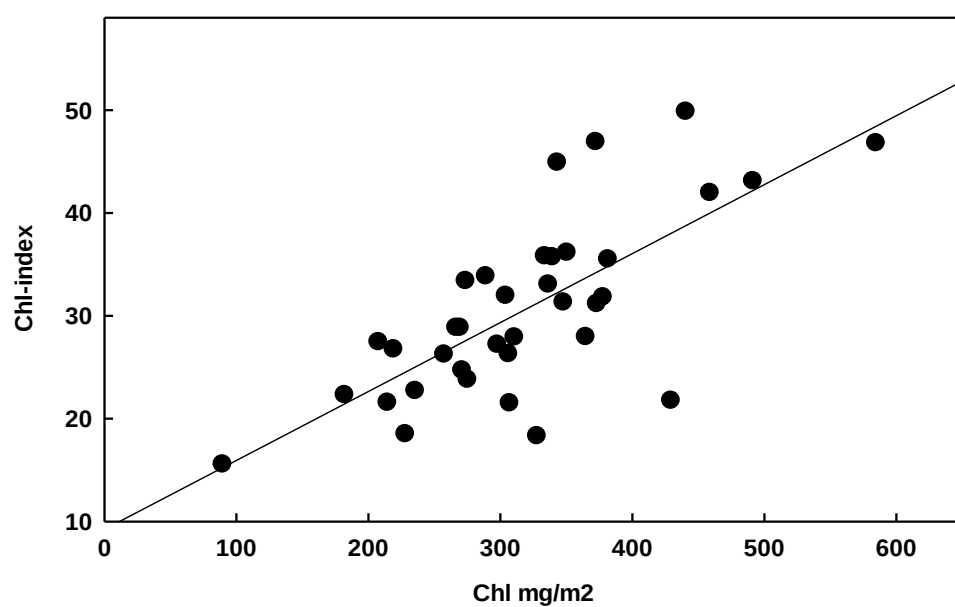


Fig. S2

Absorption spectrum of some major Flav peaks after HPLC separation. The two maxima in the UV-C and UV-A regions and the shoulder in the UV-B region are shown. The maximum at approximately 350 nm was used to calculate the peak area.

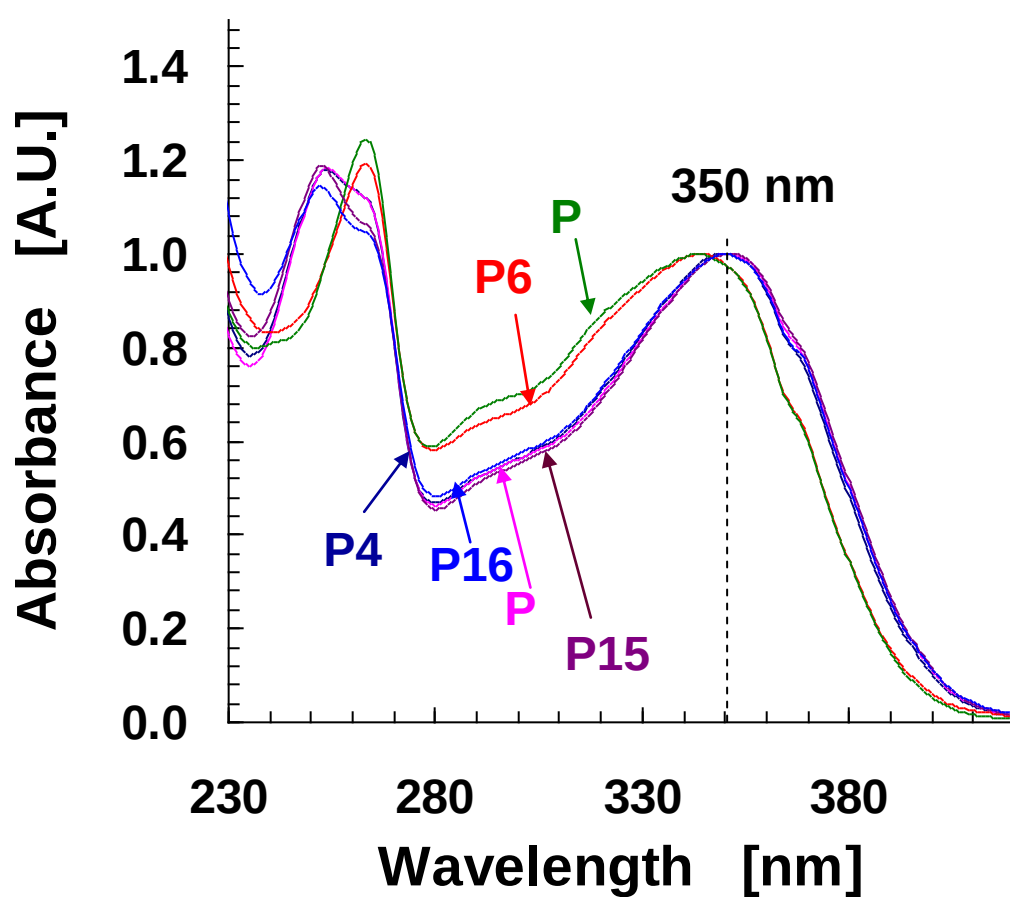


Fig. S3

Single Ion Record of $m/z = 611$ $[M+H]^+$, revealing the three major pentahydroxyflavones of a sun leaf. 25 mm² were scratched from the adaxial epidermis and immediately dipped into 100 μ L methanol/water (80/20, v/v), sonicated and centrifuged. 20 μ L of the solution was injected into the Rheodyn LC-MS. The mass-to-charge ratio $m/z = 611$ corresponds to the pseudomolecular parent ion of P4 and P6, and to one major fragment of P5. The four runs are plotted with the same scale. The mesophyll collected from the abaxial epidermis removal of the corresponding surface have lower amount of flavonoids.

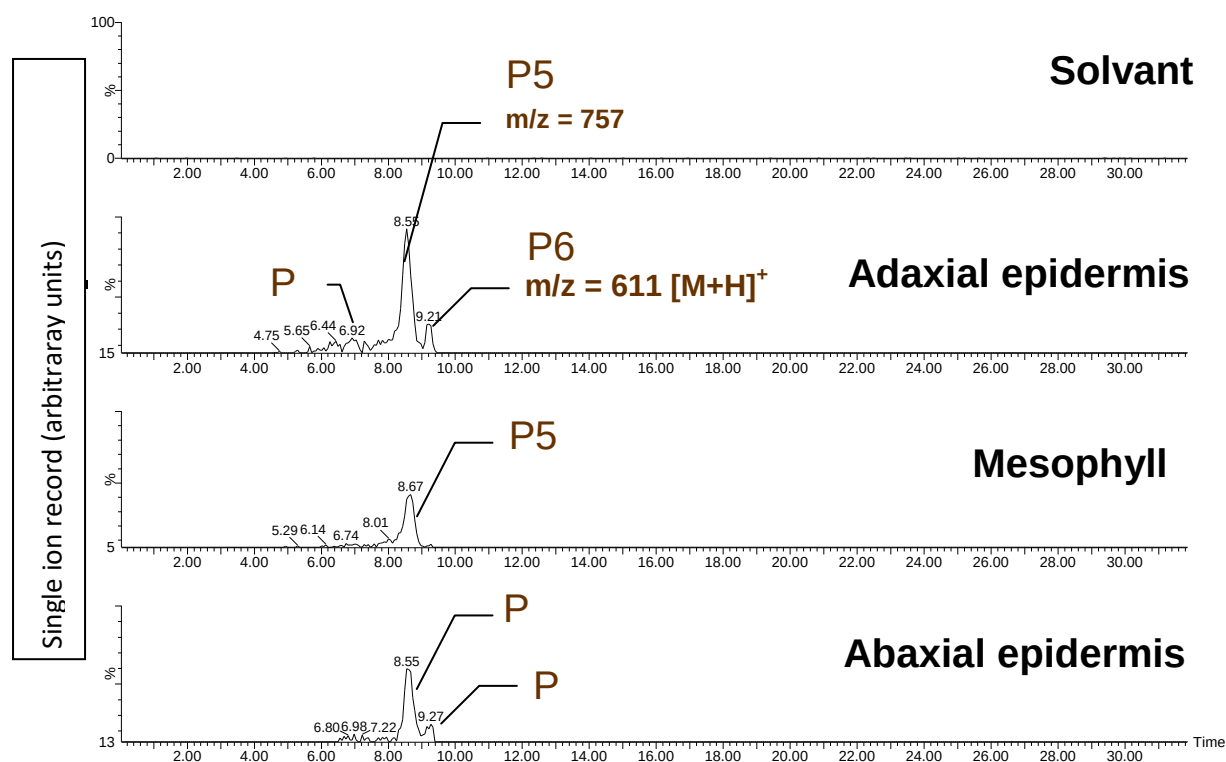


Fig S4

The eight tightest correlation ($R^2 > 0.25$) from table 4. Relationships between DEA_{375} and Car (mg m^{-2}), DEA_{375} and Car/Chl, DEA_{375} and LMA ($g\ m^{-2}$), Abaxial DEA_{375} and stomatal density, Abaxial trichome density and stomatal density, epidermal cell density and stomatal density. After logarithmic transformation, the mass based Chl-index (Chl index/LMA), the Chl-index to the DEA_{375} ratio (Chl-index/ DEA_{375}) were correlated to LMA. The regression parameter and the significance level (r^2) are indicated Table 4.

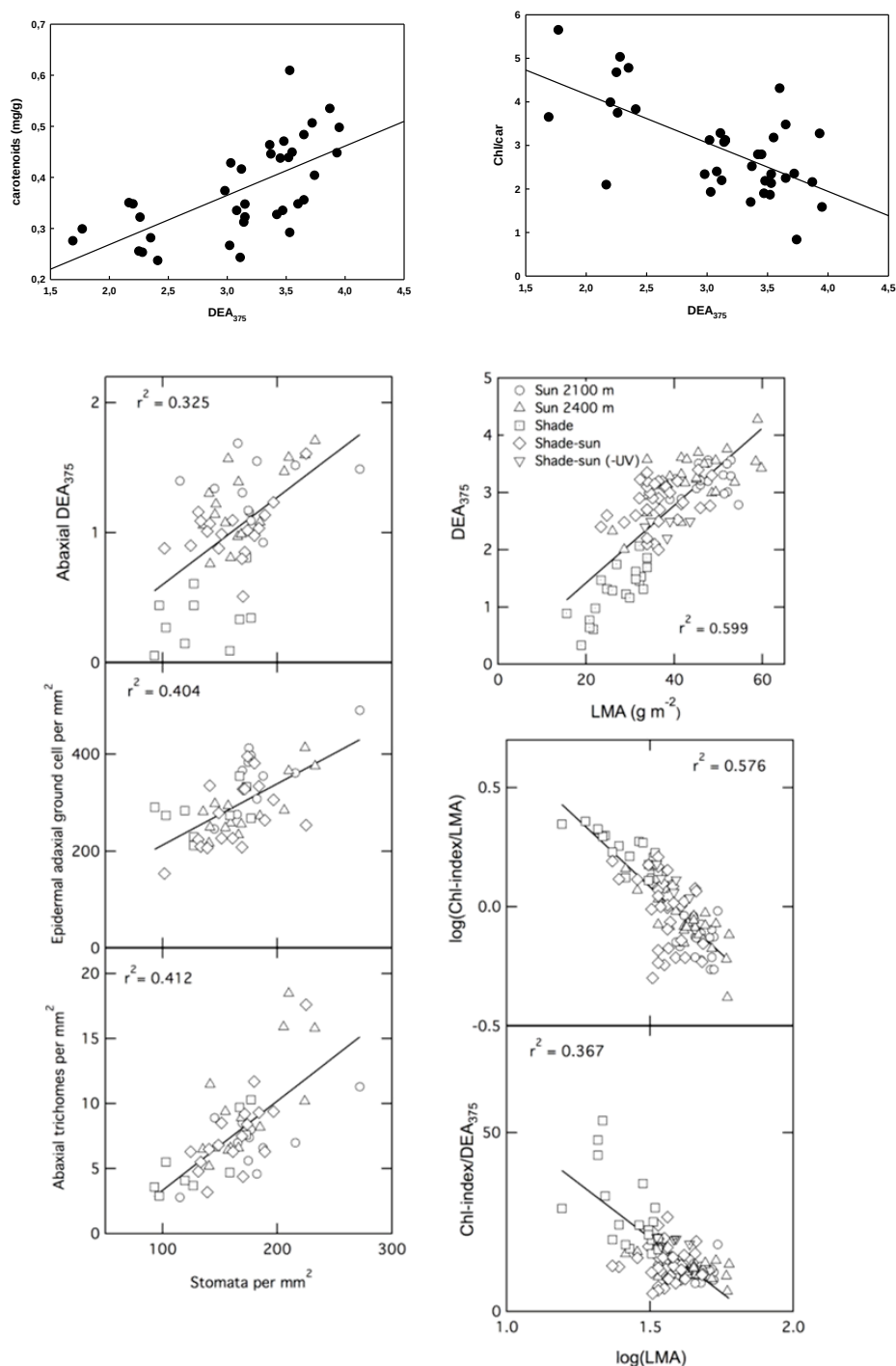


Fig. S5

Relationship between the Chl-index/DEA₃₇₅ ratio and LMA in *S. alpina* leaves. Plants were grown at 2100 m, in shade, shade transferred to sun, shade transferred to sun with a UV filter and sun, and in sun at 2400 m. One point corresponds to one leaf. **A.** All the leaves from three experiments (2015-2017). **B.** Leaves from one representative plant per treatment.

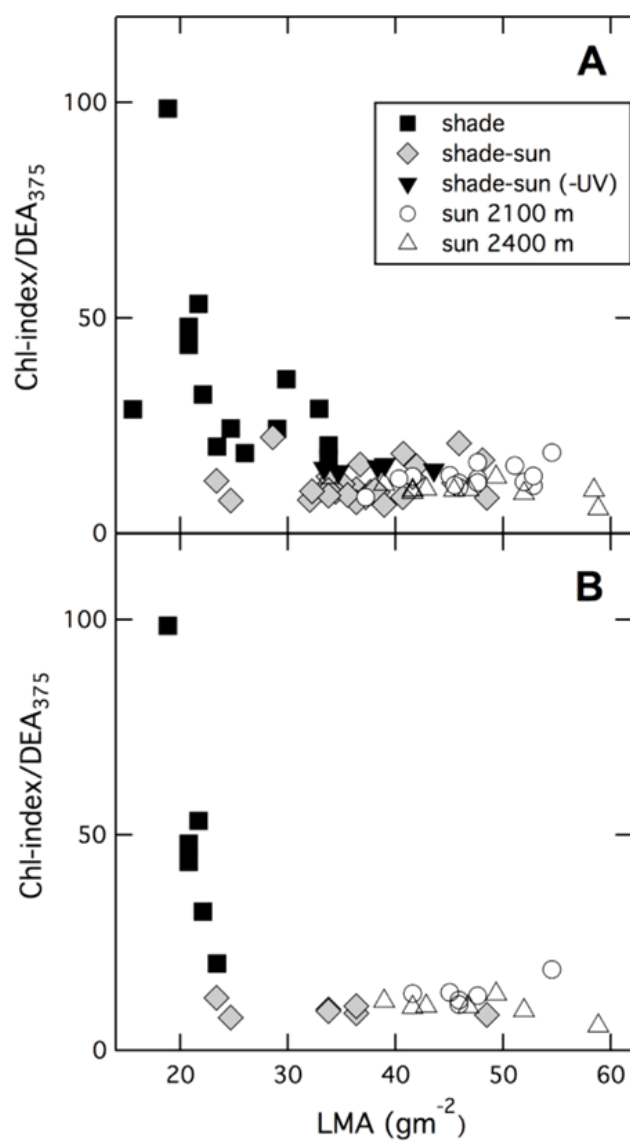


Table S1

Level of significance of the HPLC determined leaf area based peak area of the individual Flav shown in Fig. 2 and indicated with their peak number of *S. alpina* leaves collected from the shade (Sh), transferred from shade to sun (Sh-sun), transferred from shade to sun in the presence of a filter blocking UV radiation (Sh-sun-F) and sun leaves at 2100 m. The table show the respective p -value

	Sh-sun	Sh-sun-F	sun		Sh-sun	Sh-sun-F	sun		Sh-sun	Sh-sun-F	sun
DA				P1				P2			
Sh	<0.001	<0.001	<0.001		0.06	0.136	0.166		<0.001	<0.001	0.058
Sh-sun	0.693		0.039		0.116		0.09		0.247		0.201
Sh-sun-F			0.141				0.59				0.533
P3				P4				P5			
Sh	0.003	0.665	0.399		0.018	0.001	<0.001		<0.001	0.005	<0.001
Sh-sun	0.002		0.01		0.528		0.703		0.893		0.725
Sh-sun-F			0.299				0.602				0.683
P6				P7				P8			
Sh	0.018	0.026	0.018		0.014	0.031	0.065		0.106	0.010	0.008

Sh-sun	0.793	0.485		0.846	0.883		0.814	0.215		
Sh-sun-F		0.686			0.985			0.152		
P9			P10			P11				
Sh	0.172	0.048	0.004		0.004	0.001	0.025	0.017	0.004	0.026
Sh-sun		0.593	0.368			0.899	0.100		0.099	0.191
Sh-sun-F			0.043				0.048			0.728
P12			P13			P14				
Sh	0.045	<0.001	0.002		0.017	0.012	0.002	0.014	0.017	0.001
Sh-sun		0.38	0.484			0.992	0.204		0.265	0.048
Sh-sun-F			0.713				0.138			0.424
P15			P16			P17				
Sh	0.001	0.005	0.036		0.025	0.09	0.042	<0.001	0.003	0.001
Sh-sun		0.435	0.764			0.998	0.065		0.742	0.311
Sh-sun-F			0.707				0.165			0.637
P18			P19			P20				
Sh	0.006	0.005	0.028		0.001	<0.001	0.003	0.003	<0.001	<0.001
Sh-sun		0.357	0.046			0.359	0.026		0.084	0.069
Sh-sun-F			0.016				<0.001			0.871

P21				P22				P23			
Sh	0.006	0.003	0.027		<0.001	0.030	0.079		<0.001	<0.001	<0.001
Sh-sun		0.08	0.297			0.845	0.225			0.407	0.006
Sh-sun-F			0.497				0.433				0.027

Table S2

Level of significance of the HPLC determined leaf area based peak area of the Flav family shown in Fig. 3A of *S. alpina* leaves collected from the shade (Sh), transferred from shade to sun (Sh-sun), transferred from shade to sun in the presence of a filter blocking UV radiation (Sh-sun-F) and sun leaves or from sun conditions. The table show the respective p -value

	Sh-su	Sh-sun-F	Sun		Sh-sun	Sh-sun-F	sun
Tetra-hydroxy-flavones				Penta-hydroxy-flavones			
Sh	0.061	0.009	0.003		<0.001	0.003	<0.001
Sh-sun		0.805	0.375			0.751	0.476
Sh-sun-F			0.14				0.806
Tri-hydroxy-di-methoxy-flavones				Penta-hydroxy-methyl-flavones			
Sh	<0.001	<0.001	<0.001		0.001	0.002	<0.001
Sh-sun		0.917	0.009			0.458	0.322
Sh-sun-F			0.028				0.914

Table S3

Level of significance of the HPLC determined leaf area based peak area of the glycosylation of Flav as shown in Fig. 3B of *S. alpina* leaves collected from the shade (Sh), transferred from shade to sun (Sh-sun), transferred from shade to sun in the presence of a filter blocking UV radiation (Sh-sun-F) and sun leaves. The table show the respective *p*-value

	Sh-sun	Sh-sun-F	sun		Sh-sun	Sh-sun-F	sun
Di-rhamnose-di-hexose				Di-rhamnose-hexose			
Sh	0.005	0.079	0.047		<0.001	0.006	<0.001
Sh-sun		0.014	0.009			0.874	0.437
Sh-sun-F			0.701				0.686
Rhamnose-hexose				Hexose			
Sh	0.045	0.003	0.002		<0.001	<0.001	0.008
Sh-sun		0.826	0.523			0.499	0.774
Sh-sun-F			0.227				0.385
Tri-glucoronide				Di-glucoronide			
Sh	<0.001	<0.001	<0.001		0.004	0.001	0.025
Sh-sun		0.539	0.019			0.899	0.1
Sh-sun-F			0.021				0.048
Glucoronide							
Sh	<0.001	0.19	0.001				
Sh-sun		0.742	0.311				
Sh-sun-F			0.637				

Take home message :

- Au cours de la période de végétation, les feuilles de *S.alpina* sont progressivement ombragées par les plantes alentour. A la fin de la période de végétation, à cause des pâturages ou de la sénescence du reste de la végétation, elles se retrouvent confrontées à des intensités importantes.
- L'acclimatation des feuilles *S.alpina* à une augmentation de l'intensité lumineuse passe par l'augmentation de ses capacités de photoprotection et d'absorption dans les UV A et B.
- L'induction de la synthèse de flavonoïdes (au niveau de la cuticule et du mésophylle) est responsable de cette augmentation de la photoprotection.
- Chez *S.alpina*, on a répertorié 23 flavonoïdes appartenant à 4 familles différentes.
- L'induction des flavonoïdes est à priori au moins indépendante de la quantité d'UV et dépend en grande partie de la luminosité.

Dans la partie suivante on se demandera si l'acclimatation des feuilles de *S.alpina* à une augmentation de l'intensité lumineuse passe aussi par une acclimatation de la physiologie de *S.alpina* et par des adaptations morphologiques à plus long terme.

Chapitre 2 :

Acclimatation dynamique d'une plante alpine, *Soldanella alpina* L. à la lumière.

Abstract :

In the French Alps, *Soldanella alpina* (*S.alpina*) grow under shade and sun conditions during the vegetation period. This species was investigated as a model for the dynamic acclimation of shades leaves to the sun under natural alpine conditions, in terms of photosynthesis and leaves anatomy. Photosynthetic activity in sun leaves was only slightly higher than that of shade leaves. The leaf thickness, the stomatal density and epidermal flavonoid content were markedly higher and the chlorophyll/flavonoid ratio significantly lower in sun than shade leaves. Sun leaves also had a more oxidised plastoquinone pool, their PSII efficiency in light was higher, and their non-photochemical quenching (NPQ) capacity was higher than that of shade leaves. Shade-sun transferred leaves increased their leaf thickness, stomatal density and epidermal flavonoid content, while their photosynthetic activity and chlorophyll/flavonoid ratio declined compared to shade leaves. Parameters indicating protection against high light and oxidative stress, such as NPQ and ascorbate peroxidase; increased in shade-sun transferred leaves, and leaf mortality also increased. We conclude that the dynamic acclimation of *S. alpina* leaves to high light under alpine conditions mainly concerns anatomical and epidermal flavonoid acclimation, as well as an increase in antioxidative protection. However, this increase in protection is not large enough to prevent damage under stress conditions, or replace damaged leaves.

Résumé :

Dans les Alpes françaises, *Soldanella alpina* (*S.alpina*) pousse à l'ombre comme au soleil pendant la période de végétation. Cette espèce a été étudiée en tant que modèle pour l'acclimatation dynamique des feuilles au soleil dans des conditions alpines naturelles, en termes de photosynthèse et d'anatomie foliaire. L'activité photosynthétique des feuilles de soleil n'était que légèrement supérieure à celle des feuilles d'ombre. L'épaisseur des feuilles, la densité stomatique et la teneur en flavonoïdes de l'épiderme étaient nettement plus élevées et le rapport chlorophylle / flavonoïdes nettement plus faible au soleil que les feuilles d'ombrage. Les feuilles du soleil présentaient également un pool de plastoquinone plus oxydé, leur efficacité PSII à la lumière était supérieure et leur capacité de désactivation non photochimique (NPQ) était supérieure à celle des feuilles d'ombrage. Les feuilles transférées ombre-soleil ont augmenté l'épaisseur de leurs feuilles, leur densité stomatique et leur contenu en flavonoïdes épidermiques, tandis que leur activité photosynthétique et leur rapport chlorophylle / flavonoïde ont diminué par rapport aux feuilles ombragées. Paramètres indiquant la protection contre les niveaux élevés de lumière et de stress oxydatif, tels que NPQ et l'ascorbate peroxydase; augmentation du nombre de feuilles transférées à l'ombre et au soleil, et mortalité des feuilles également. Nous concluons que l'acclimatation dynamique des feuilles de *S. alpina* à une lumière intense dans des conditions alpines concerne principalement l'acclimatation des flavonoïdes anatomiques et épidermiques, ainsi que l'augmentation de la protection antioxydante. Toutefois, cette protection accrue n'est pas suffisante pour prévenir les dommages en cas de stress ou remplacer les feuilles endommagées.

Dynamic acclimation to sunlight in an alpine plant, *Soldanella alpina* L.

Anne-Claire Talhouët^a, Sylvie Meyer^{a,b}, Xavier Baudin^c and Peter Streb^{a,*} 

^aLaboratoire Ecologie Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France

^bUniversité Paris Diderot, F-75475, Paris, France

^cPlate-forme de recherche ImagoSeine, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, Université Paris Diderot, F-75013 Paris, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: peter.streb@u-psud.fr

Received 5 February 2019;
revised 19 April 2019

doi:10.1111/ppl.12982

In the French Alps, *Soldanella alpina* (*S. alpina*) grow under shade and sun conditions during the vegetation period. This species was investigated as a model for the dynamic acclimation of shade leaves to the sun under natural alpine conditions, in terms of photosynthesis and leaf anatomy. Photosynthetic activity in sun leaves was only slightly higher than in shade leaves. The leaf thickness, the stomatal density and the epidermal flavonoid content were markedly higher, and the chlorophyll/flavonoid ratio was significantly lower in sun than in shade leaves. Sun leaves also had a more oxidised plastoquinone pool, their PSII efficiency in light was higher and their non-photochemical quenching (NPQ) capacity was higher than that of shade leaves. Shade-sun transferred leaves increased their leaf thickness, stomatal density and epidermal flavonoid content, while their photosynthetic activity and chlorophyll/flavonoid ratio declined compared to shade leaves. Parameters indicating protection against high light and oxidative stress, such as NPQ and ascorbate peroxidase, increased in shade-sun transferred leaves and leaf mortality increased. We conclude that the dynamic acclimation of *S. alpina* leaves to high light under alpine conditions mainly concerns anatomical features and epidermal flavonoid acclimation, as well as an increase in antioxidative protection. However, this increase is not large enough to prevent damage under stress conditions and to replace damaged leaves.

Introduction

Soldanella alpina is one of the few alpine plant species, with leaves that can be photosynthetically active throughout at least two vegetation periods, which are interrupted by a long winter, and whose leaves remain green under the snow (Streb and Cornic 2012). New leaves are formed during the summer. At the Lautaret pass (2100 m altitude) in the French Alps, *S. alpina* plants are often overgrown by the surrounding vegetation. Some of the newly formed leaves grow

under shade conditions, whereas others are exposed to sunlight during growth (Laureau et al. 2015).

Plants acclimate to the incident light intensity by adjusting the ratio of primary and secondary photosynthetic reactions (Anderson and Osmond 1987, Bailey et al. 2001, Walters 2005). Shade plants increase the capacity of light absorption relative to carbon assimilation. Shade leaves have a higher ratio of light harvesting complexes to reaction centres than sun leaves, and a lower chlorophyll (CHL) *a/b* ratio. Sun acclimated leaves have a higher capacity for Calvin cycle activity and

Abbreviations – A_N , net carbon assimilation; C_i , internal CO₂ partial pressure; CHL, chlorophyll; DA₃₇₅, Dualex absorption at 375 nm; LA, leaf area; LMA, dry leaf mass per area; NPQ, non-photochemical quenching; PFD, photon flux density.

Rubisco content compared to shade leaves and leaves are overall thicker (Anderson and Osmond 1987, Bailey et al. 2001, Walters 2005). Light acclimation of leaves can be visualised by measuring photosynthetic carbon assimilation as a function of photon flux density (PFD) and as a function of internal CO₂ partial pressure (*C_i*). Shade leaves show a lower photosynthetic compensation point, saturate at lower light intensity and have a lower maximum photosynthetic activity compared to sun leaves (Anderson and Osmond 1987, Bailey et al. 2001, Walters 2005, Priault et al. 2006).

Shade and sun acclimation have often been compared for leaves developed under either constant high or low PFD (Anderson and Osmond 1987, Walters 2005), and more recently under controlled fluctuating light conditions (Athanasίου et al. 2010, Yamori 2016, Violet-Chabrand et al. 2017). In nature, mature sun leaves may be shaded by overgrowing of newly formed leaves or by other plants later in the season. Shade leaves may suffer from sunflecks, inducing several light protecting strategies and/or photoinhibition of photosynthesis (Yamori 2016). Dynamic acclimation capacities of mature shade leaves to controlled higher light conditions depended on species and acclimation time. Partial or complete dynamic photosynthetic acclimation was achieved in *Chenopodium album* and rice within a few days (Oguchi et al. 2003, Murchie et al. 2005), and in several different cultivated species within 1 week (Amiard et al. 2005), but required 6 weeks in *Hedera helix* (Bauer and Thöni 1988), while *Alocasia macrorrhiza* mature leaves did not acclimate at all (Sims and Pearcy 1992). Several *Arabidopsis thaliana* accessions can acclimate within 9 days, while other accessions are unable to acclimate (Athanasίου et al. 2010). Similar results were obtained for avocados and different liana species several weeks after changing the light condition (Matsubara et al. 2012, Avalos and Mulkey 2014).

Leaves from *S. alpina* plants grown in the Lautaret area show characteristics of shade and sun acclimation. Originally, shade and sun leaves were discovered by measuring the ultraviolet (UV)-A absorbance at 375 nm with the Dualex leaf clip (DA₃₇₅), indicating the epidermal flavonoid contents (Laureau et al. 2015). This was confirmed by a lower dry leaf mass per area (LMA), a lower CHL *a/b* ratio, a higher Carotenoid/CHL ratio and a lower activity of ascorbate peroxidase in shade leaves compared to sun leaves (Laureau et al. 2015). However, under natural conditions, shade leaves will receive full sunlight before winter. Either animal grazing may remove the shading vegetation, or the shading vegetation becomes senescent. Hence, a highly dynamic leaf acclimation to changing light environment is expected in this species.

The flavonoid content of *S. alpina* shade leaves, measured using the DA₃₇₅, increased when they were suddenly exposed to full sunlight through artificial removal of the shading vegetation (Laureau et al. 2015). Flavonoids are preferentially located in epidermal cells of *S. alpina* and strongly absorb UV radiation, thus reducing the UV-load of photosynthetic cells (Laureau et al. 2015). UV radiation is more effective than visible radiation in inducing PSII photoinhibition (Takahashi et al. 2010), therefore the high flavonoid levels in *S. alpina* leaves protect them from photoinhibition, contrary to leaves with low flavonoid contents (Laureau et al. 2015). The UV shielding function of flavonoids is widely accepted, but flavonoids can also act as antioxidants and may protect from oxidative damage caused by excess light (Agati and Tattini 2010, Agati et al. 2012). However, even though the increase in flavonoids in shade-sun transferred leaves strongly slowed down PSII photoinhibition, it did not fully alleviate it under natural conditions (Laureau et al. 2015), and photosynthetic response to such light transfer needs to be further analysed.

Considering the strong variations in PFD received by *S. alpina* leaves and the fact that the same leaves can be photosynthetically active during two vegetation periods, *S. alpina* was investigated as a model for dynamic light acclimation capacity in mature leaves. Under natural conditions, *S. alpina* leaves are further challenged by alpine stress conditions, such as very high PFD and UV-radiation in the sun as well as temperature stress (Streb and Cornic 2012). It is unknown whether the various states of leaf acclimation to light observed in *S. alpina* in the field (Laureau et al. 2015), resulted from developmental processes or from the plasticity of fully developed leaves. In the present investigation we therefore studied the ability of *S. alpina* leaves to adjust the photosynthesis and leaf anatomy of shade leaves transferred to the sun. Some antioxidative enzymes were also investigated for their potential protection against oxidative stress and the leaf turnover after a change in the light environment.

Material and methods

Plant material, site and experimental design

Soldanella alpina shade and sun plants were investigated at 2100 m elevation in the years 2015–2018 in the vicinity of the Lautaret pass (45°02'12.3"N 6°24'06.8"E; Laureau et al. 2015). *Soldanella alpina* grow at this site over an area of approximately 50 m² on an east facing slope with partial dense vegetation and partial exposed steep sites. Selection of plants was based on (1) visible shading by dense vegetation (shade) or sun exposure of plants

Table 1. Characteristics of *S. alpina* shade and sun leaves at the start of the experiment (s) or 24–30 days later at the end of the experiment (e) and after transfer of shade leaves to the sun (shade-sun). The table shows leaf UV absorbance as the sum of the upper and lower leaf surfaces (DA₃₇₅), CHL index, the ratio of CHL index/DA₃₇₅, the maximum photosynthetic activities (Pmax) at a PFD of 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 400 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ air partial pressure; (light) and at a PFD of 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ air partial pressure; (CO₂), dark respiration, the light compensation point (LCP), the CO₂ compensation point (Ci) and the stomatal conductance to water vapour (gs) after stabilisation at a PFD of 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 400 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ (Ca). Values are means and standard errors of three to four independent plants. All measurements were done on the same leaf. The LCP and the CO₂ compensation point were estimated from Figs 2, 3; Figs S1, S2. Statistic differences at the $P < 0.05$ level is indicated by different letters.

	Shade (s)	Shade (e)	Sun (s)	Sun (e)	Shade-sun
DA ₃₇₅	1.4 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^c	3.4 ± 0.1 ^c	2.9 ± 0.1 ^b
CHL index	33.7 ± 1.4 ^a	42.3 ± 1.1 ^b	31.2 ± 0.4 ^{ac}	29.6 ± 2.7 ^{ac}	26.9 ± 1.6 ^c
CHLindex/DA ₃₇₅	22.6 ± 3.8 ^a	24.8 ± 1.4 ^a	9.4 ± 0.3 ^b	8.6 ± 0.8 ^b	9.1 ± 0.9 ^b
Pmax (light) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	8.7 ± 0.6 ^a	8.0 ± 0.8 ^{ab}	9.6 ± 0.3 ^a	9.1 ± 0.8 ^a	6.5 ± 0.4 ^b
Pmax (CO ₂) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	23.5 ± 1.6 ^{ab}	24.2 ± 1.5 ^{ab}	27.3 ± 0.3 ^b	27.5 ± 1 ^b	21.5 ± 0.9 ^a
Dark respiration, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-1.3 ± 0.4 ^{ab}	-0.74 ± 0.08 ^a	-1.12 ± 0.3 ^{ab}	-1.4 ± 0.2 ^b	-1.04 ± 0.1 ^{ab}
LCP $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	16.4	10.7	19.2	20.9	16.7
Ci comp. point $\mu\text{mol mol}^{-1}$	73	67	71	70	83
gs	0.13 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^{bc}	0.10 ± 0.01 ^{ac}	0.097 ± 0.01 ^{abc}	0.075 ± 0.004 ^b

and (2) the proximity of plants and their abundance in the respective microhabitat. In particular, shade and shade-sun transferred plants were selected when they grew in direct proximity. The shade and sun acclimation were verified by measuring either a low or a high UV-A absorbance (DA₃₇₅) of the leaves using Dualex (FORCE-A; Table 1) according to Laureau et al. (2015). The first measurements were done at the beginning of July on fully developed young leaves of *S. alpina* and the second measurements took place at the end of July, 24–30 days later. The surrounding shading vegetation was cut from one part of the shaded plants to expose them to full sunlight between the two measurements. The PFD was monitored during the experiment by fixing quantum sensors in the reference year 2015 directly beneath two independent leaves per treatment. The PFD was recorded every 30 s with a data logger (Campbell, CRX30). Maximum PFD were stored and mean values during the day were calculated every hour between 8 am and 6 pm (Fig. 1).

PFD received by leaves and precipitation during the experimental period

The calculated mean daily PFD received by sun and shade-sun transferred leaves (800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was nearly three times higher than that for shade leaves (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Mean hourly maximum PFDs were as high as 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under sun conditions, and around 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under shade conditions (Fig. 1). Shade leaves also received high peak levels of PFD during sunflecks of up to 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The shade leaves received more light at the beginning of the experimental period compared to the end because of the increasing overgrowth of the surrounding vegetation

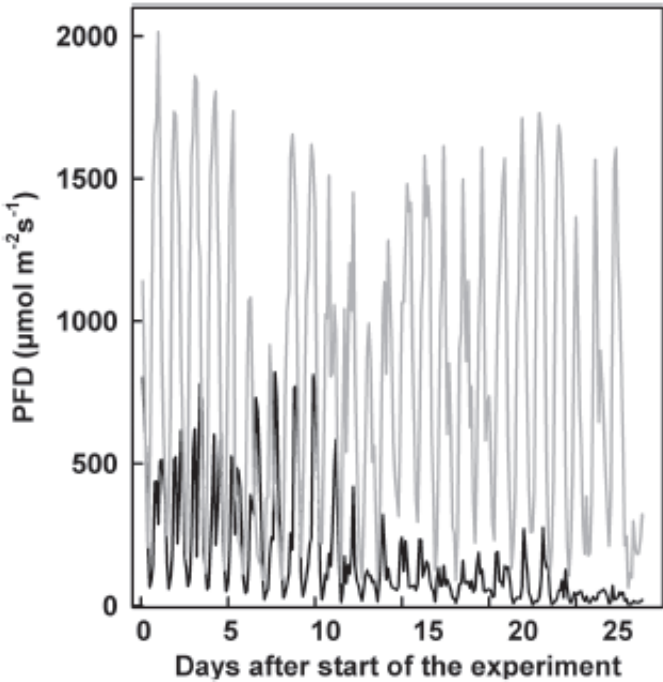


Fig. 1. PFD received by shade and sun leaves of *S. alpina* during the experimental period in 2015. For shade (black) and sun leaves (grey) two quantum sensors per treatment were fixed directly beneath two independent leaves and mean values are shown. The PFD was recorded every 30 s and mean values calculated every hour between 8 am and 6 pm.

(Fig. 1). The precipitation at the experimental site over the two consecutive years 2016 and 2017 was taken from ROMMA, the Lautaret climatic station (http://www.romma.fr/station_24.php?id=21&tempe=1) and results are shown in Table 2. Precipitation was particularly low in 2016 in the first 18 days, but more constant over the experimental period in 2017.

Table 2. Total precipitation in mm in the Lautaret area during the investigation period in the years 2016 and 2017. Precipitation was taken from ROMMA the Lautaret climatic station (http://www.romma.fr/station_24.php?id=21&tempe=1).

	One period 8 days	Two period 10 days	Three period 10 days	Four period 11 days
2016	3	1.8	34	40.6
2017	38.6	12.6	19	29.2

Leaf surface, LMA and survival of leaves

The leaf area (LA) of up to six different plants growing under shade, sun or shade-sun conditions were estimated continuously (two measurements per week) on the growing site over two consecutive years (2016 and 2017), by measuring the leaf diameter (length $\times$ width) and estimating the surface. In both years, all leaves of these plants were also investigated for leaf senescence, leaf mortality and the formation of new leaves over a period of up to 39 days beginning at the end of June. A leaf was defined senescent when more than 25% of the LA had visibly lost its CHL. Dead leaves had visibly no CHL. The leaf mass per area (LMA) was measured according to Laureau et al. (2015) on a large number of leaves at the end of the experiment.

Optical measurements of UV-absorbance and CHL content

The Dualex 3.3 (FORCE-A) was used to measure the absorbance of UV-A at 375 nm by epidermal flavonoids according to Laureau et al. (2015). The Dualex 4 Scientific leaf clip (FORCE-A) was also used to measure UV-A absorbance by epidermal flavonoids and CHL content of attached leaves (Cerovic et al. 2012). The Dualex 4 Scientific estimates CHL contents on a surface basis and it was assigned CHL index in Table 1 (Cerovic et al. 2012).

Leaf anatomy

Images of leaf surfaces and hand cut leaf sections were taken using an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver.Z1, Zeiss) equipped with a monochrome-cooled sCMOS camera (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu), a colour-cooled CCD camera (Axio-cam HRC, Zeiss) and an LED lamp (pE-300 white, CoolLED) for fluorescence excitation. The filters used are described in Laureau et al. (2015). Stomata density was determined using images of UV-excited blue fluorescence according to Laureau et al. (2015). The leaf, palisade and spongy mesophyll thickness were

measured on images of UV-excited visible fluorescence using the Plan-Apochromat 10 $\times$ NA 0.45 objective (Zeiss). Experiments were automated using Zen software (Zen 2 blue edition, Zeiss) and images were processed using Image J 1.45 s (National Institutes of Health).

Gas exchange and CHL fluorescence

Net CO₂ uptake by leaves in combination with CHL fluorescence emission was measured using a LI-6400XT (Licor Inc.) equipped with a leaf chamber fluorometer 6400-40 under controlled conditions in the Lautaret Alpine Station laboratory (approximately 200 m from the growing site of the plants). Intact plants were transferred into pots directly before measurements. Multiple internal tests have shown that this transfer procedure imposed the least stress possible (compared to the transfer of detached leaves for example). Photosynthetic results could be repeated after several days in plants transferred to pots and plants were viable for several years. Attached leaves were inserted in the leaf chamber (2 cm²) and dark-adapted for at least 30 min to measure dark respiration and minimal (F_o) and maximum (F_m) chlorophyll fluorescence. Afterwards, leaves were acclimated to 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD. After stabilisation of net carbon assimilation (A_N) and stomatal conductance (approximately 30 min), A_N /PFD (at 400 ppm C_a) and A_N/C_i (at 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD) response curves in 21% oxygen were measured. Acclimation was repeated when experimental conditions (CO₂, PFD) changed. Gas exchange and CHL fluorescence measurements were recorded after the signal stabilised (between 5 and 8 min after changing PFD or CO₂ partial pressure). A saturating light flash of 1.2 s, followed by darkness and far red light was applied after gas exchange measurements to determine F' , F_m' and F_o' . The F_o , F_m , F_o' , F_m' and F' nomenclature and calculation of NPQ, ΦPSII and qL were taken from Baker (2008). The whole Licor leaf-chamber was maintained in a double closed thermostatic chamber to avoid any external gas exchange (Laureau et al. 2013). Measurements were done at leaf temperatures of 25°C and a leaf water pressure deficit of approximately 1 kPa (Laureau et al. 2013). The light compensation point and the quantum efficiency were determined from the graph, showing A_N vs PFD and the CO₂ compensation point from the graph A_N vs C_i .

Biochemical measurements

Enzyme measurements of catalase (EC1.11.1.6), glycolate oxidase (EC 1.1.3.1), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (EC 1.6.4.2) were done as previously described by Laureau et al. (2011).

Table 3. Changes in the total leaf area of *S. alpina* leaves, as estimated by the diameter of the leaves (length x width) during the vegetation period in two consecutive years (2016 and 2017). The leaf area (LA, cm²) was estimated at the beginning of the investigation period and regularly (two times per week) for at least 30 days. *S. alpina* leaves grown in the shade, in sun and transferred from shade to sun at 2100 m altitude were investigated. The results show the estimated total leaf area of at least four independent leaves. The difference between the start and the end of the investigation period was not significant at the 10% level for all conditions.

2016	Shade	Sun	Shade-sun
LA start	14.3	13.5	11.6
LA 30 days+	15.8	14.7	11.8
2017	Shade	Sun	Shade-sun
LA start	10.9	11.3	9.4
LA 30 days+	11.2	11.4	10.6

Data analysis

All gas exchange measurements were done for at least three different plants (the plant number used is indicated in the figures and tables). For enzyme measurements, four different leaves were used. The stomatal density, the LMA, the leaf palisade and spongy mesophyll thickness were investigated at the end of the experiment on a larger number of leaves collected in several years (2015–2018). The leaf number is indicated in the tables. The values shown are mean values with the standard error. Statistical analysis was done using Sigma Plot (Systat Software, Inc.) and RStudio (v.1.1.419 Inc.). Differences between mean values were assessed using a Student's *t*-test at the 0.05 significance level. All treatments were compared in a pair wise fashion and significant differences are indicated by different letters. The relationships between thickness and LMA were tested with a regression analysis.

Results

Difference between sun and shade leaves at the start of the experiments

DA₃₇₅ values were low in shade leaves and high in sun leaves. The CHL index, estimated with a Dualux 4

Scientific, was similar in both leaf types (Table 1). The ratio of CHL index/DA₃₇₅ was significantly higher in shade leaves than sun leaves (Table 1). Net carbon assimilation, as functions of PFD and *C*_i, and the light compensation point were higher in sun leaves than shade leaves (Figs S1, S2; Table 1). Even when the difference between both leaf types was not statistically significant, shade and sun acclimation were visible at saturating PFD and high *C*_i. The *C*_i compensation point, the stomatal conductance to water vapour and the dark respiration were similar in shade and sun leaves (Table 1). Therefore, gas exchange only shows small differences between shade and sun plants. In contrast, fluorescence measurements, which reflect primary photosynthetic reactions in PSII, differed markedly in shade and sun plants (Fig. 2). The parameters *q*_L and ΦPSII were higher in sun leaves than shade leaves for all measured PFDs and all *C*_i, indicating a higher oxidation state of the quinone QA and a higher electron transport rate in sun leaves (Fig. 2). NPQ was lower in sun leaves at low PFD than in shade leaves, but markedly higher at high PFD and at low *C*_i (Fig. 2).

Differences between shade and sun leaves at the end of the experiment and shade-sun transfer effects

DA₃₇₅ values in sun and shade leaves did not change during the experimental period for leaves used in gas exchange measurements (Table 1). In previous and supplemental experiments, a slight increase in shade leaf DA₃₇₅ was noticed, but it was always significantly lower than in shade-sun transferred leaves and probably dependant on heterogeneous exposition of shade leaves to sun-light on the natural growing site (Laureau et al. 2015, Fig. 1). In plants transferred from shade to sun, the total leaf DA₃₇₅ value increased markedly (Table 1), although it remained lower than in sun leaves, as reported earlier (Laureau et al. 2015). The CHL index/DA₃₇₅ ratio slightly increased in shade leaves and decreased in sun leaves between the start and the end of the experiment and decreased in shade-sun transferred leaves to the same value as in sun leaves (Table 1). Mature leaves were

Table 4. Stomatal density, LMA, leaf thickness, palisade and spongy mesophyll thickness of *S. alpina* leaves at the end of the experiment grown in shade, in sun, and transferred from shade to sun. The values shown are pooled from experiments done in four different years (2015–2018). Mean values with standard errors are shown. The number of leaves used, is indicated in brackets. Statistic differences at the *P* < 0.05 level is indicated by different letters.

	Shade	Sun	Shade-sun
Stomatal density (stomata mm ⁻²)	134 ^a ± 10(10)	183 ^b ± 13(10)	161 ^b ± 7(18)
LMA (gm ⁻²)	26.7 ^a ± 1.3(19)	47.8 ^c ± 1.1(18)	36.6 ^b ± 0.8(48)
Leaf thickness (μm)	272 ^a ± 11(12)	375 ^c ± 14(10)	315 ^b ± 9(22)
Palisadic parenchyma thickness (μm)	99 ^a ± 5(12)	146 ^c ± 8(10)	118 ^b ± 5(22)
Spongy parenchyma thickness (μm)	119 ^a ± 8(12)	158 ^c ± 8(10)	140 ^b ± 4(22)

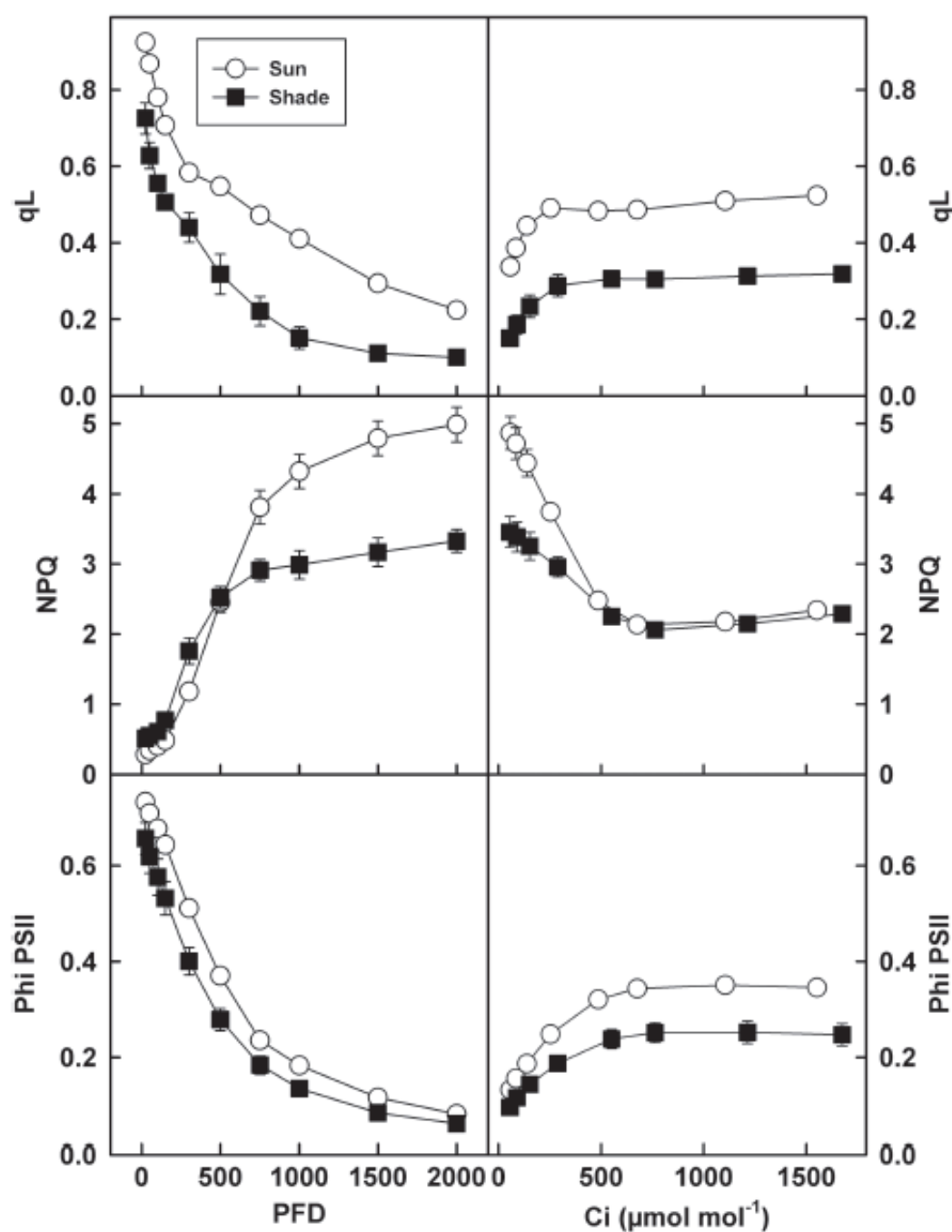


Fig. 2. Fluorescence parameters qL, NPQ and Φ_{PSII} in sun (white circles) and shade leaves (black squares) at the start of the experiment as a function of PFD and as a function of C_i . Mean values of three independent plants with standard errors are shown.

used in all experiments. During a period of more than 30 days, the LA did not change in all investigated leaves (Table 3). Continuous analysis showed that leaf expansion terminated 1 to 2 days after emergence (data not shown).

Differences in leaf anatomy consisted of a lower stomatal density, LMA, and leaf thickness in shade leaves compared to sun leaves (Table 4). Palisade and spongy mesophyll were thinner in shade than in sun leaves (Table 4). The stomatal density, LMA and leaf thickness of the shade-sun transferred leaves were higher than in shade leaves. The stomatal density in shade-sun transferred and sun leaves was not significantly different,

whereas LMA and leaf thickness were lower in shade-sun transferred leaves than in sun leaves. The thickening of the leaves was due to an increase in both palisade and spongy mesophyll thickness, with an increase in the cell size compared to shade leaves (Fig. 3). The proportion of the palisade and spongy mesophyll was similar in every treatment. In all treatments combined, leaf and mesophyll thickening explained about 50% of the LMA increase with light (Fig. 4).

Carbon assimilation curves for shade and sun leaves as a function of PFD or C_i were not very different at the end of the experiment compared to the start and remained higher in sun leaves than shade leaves

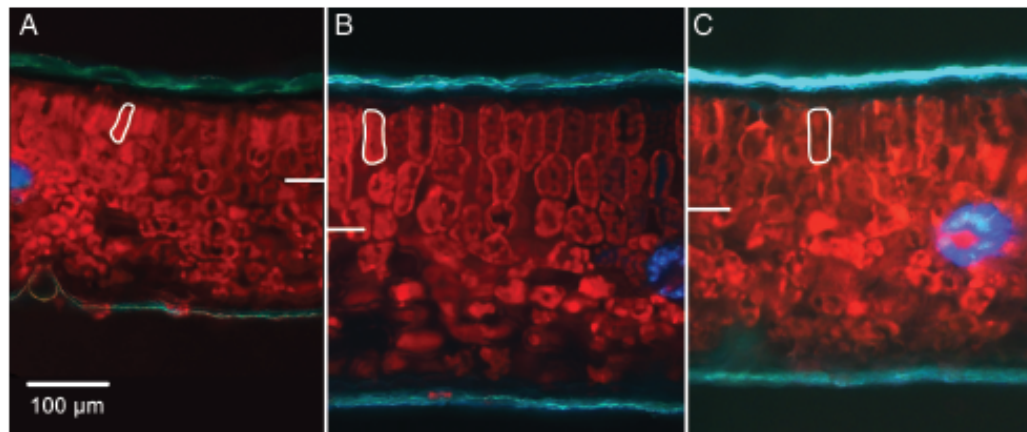


Fig. 3. Colour fluorescence microscopic images of a representative transverse section of a shade (A), sun (B) and shade-sun transferred leaf (C). The fluorescence images were obtained using a 330WB80 excitation filter and a LP400 emission filter, using a 10 $\times$ objective. The red and blue fluorescence emanated from CHL in the mesophyll and cell wall hydroxycinnamic acid, respectively (Laureau et al. 2015). For comparison, a palisade cell is circled in white and an additional white line separates the palisadic and spongy mesophyll on each image. DA₃₇₅ (sum of the two leaf sides) was 1.49, 2.98 and 2.78 in (A–C), respectively. LMA was 31.3, 51.3, 41.6 g m⁻², in (A–C), respectively.

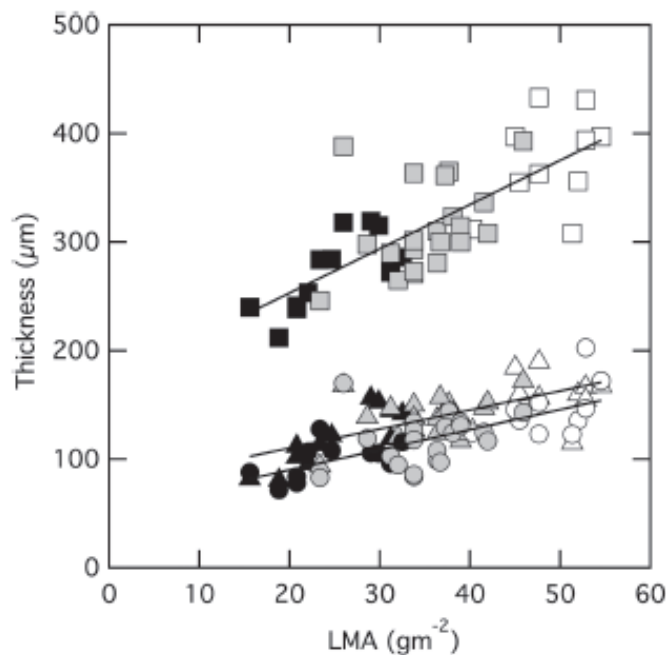


Fig. 4. Relationship between LMA and leaf thickness. The thickness of the whole leaf (squares), the palisade (circles) and spongy (triangles) mesophyll in *S. alpina* at the end of the experimental period in shade leaves (black symbols), sun leaves (open symbols) and leaves transferred from shade to sun (grey symbols) are shown. One point corresponds to one leaf. Correlations are $y = 4.1 \cdot x + 172$ ($n = 43$, $r^2 = 0.59$, $P < 0.0001$), $y = 1.9 \cdot x + 53$ ($n = 43$, $r^2 = 0.47$, $P < 0.0001$), $y = 1.8 \cdot x + 75$ ($n = 43$, $r^2 = 0.47$, $P < 0.0001$) for leaf, palisade and spongy mesophyll, respectively.

(Figs 5, 6; Figs S1, S2 and Table 1). However, the light compensation point and dark respiration decreased, and the CHL index increased in shade leaves compared to the start of the experiment, showing that shade leaves acclimated to a more shaded environment during the

investigation period (Table 1, insert Fig. 5). In shade-sun transferred leaves, carbon assimilation decreased in all conditions compared to shade leaves (Figs 5, 6). The quantum efficiency and the CO₂ compensation point were nearly identical in shade and sun leaves. The quantum efficiency was lowest in shade-sun transferred leaves, whereas the CO₂ compensation point was highest (insert Figs 5 and 6, Table 1). The stomatal conductance to water vapour was highest in sun leaves and lowest in shade-sun transferred leaves under all conditions (Figs 5, 6, Table 1).

CHL fluorescence parameters in shade and sun leaves did not change at the end of the experiment compared to the start. In shade-sun transferred leaves, qL and Φ PSII were similar to those of shade plants and different to sun plants. NPQ in shade-sun transferred plants increased at low PFD and was higher at high C_i compared to shade plants, but similar to sun plants at high PFD and low C_i (Fig. 7).

Cytoplasmic ascorbate peroxidase, glutathione reductase, catalase and glycolate oxidase activities were measured at the end of the experiment. The activity of all enzymes was not significantly different in shade compared to sun leaves, but was higher in sun leaves. In shade-sun transferred leaves, the activity of all enzymes increased compared to shade leaves, except for glycolate oxidase. The increase was only significant for ascorbate peroxidase (Fig. 8).

Turnover of shade-sun transferred leaves

The turnover of leaves was investigated in the two consecutive years 2016 and 2017 (Table 5). In the year 2016,

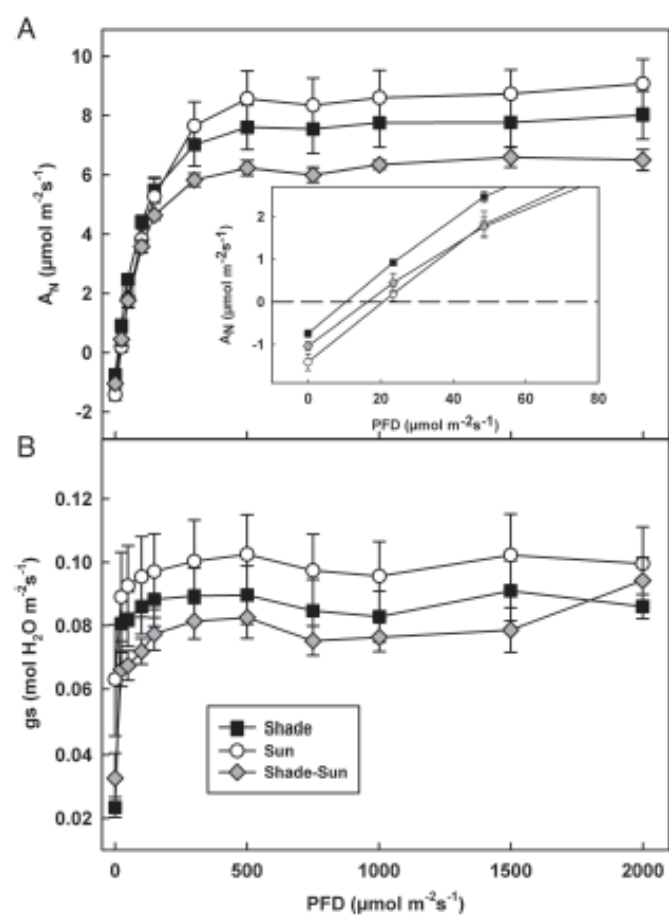


Fig. 5. Photosynthetic net carbon assimilation (A_N) and stomatal conductance to water vapour (g_s) of *S. alpina* leaves at the end of the experiment, (A) and (B), respectively. Shade leaves are represented by black squares, sun leaves by white circles and leaves transferred from shade to sun are shown as grey diamonds, all as a function of PFD. Insert: expansion of the scale at low PFD. Mean values with standard errors of experiments with three independent sun plants and four independent shade and shade-sun transferred plants are shown.

precipitation was particularly low during the first 18 days after the start of the experiment, suggesting that plants suffered from some drought stress (Table 2). In shade plants, the leaf number slightly increased by one leaf during a 39 days observation period. In 2016, five leaves died and two were senescent and they were replaced by six new leaves. In 2017, only one leaf was newly synthesised, while no leaves were senescent or died. In sun leaves, the leaf number increased during the vegetation period in both years. However, the number of dead and senescent leaves in 2016 was equal to the number of newly formed leaves. In plants transferred from shade to sun, the leaf number decreased in both years, but this was more pronounced in 2016. In fact, in 2016 one plant in five completely died, while only one leaf remained on two plants in five (Table 5).

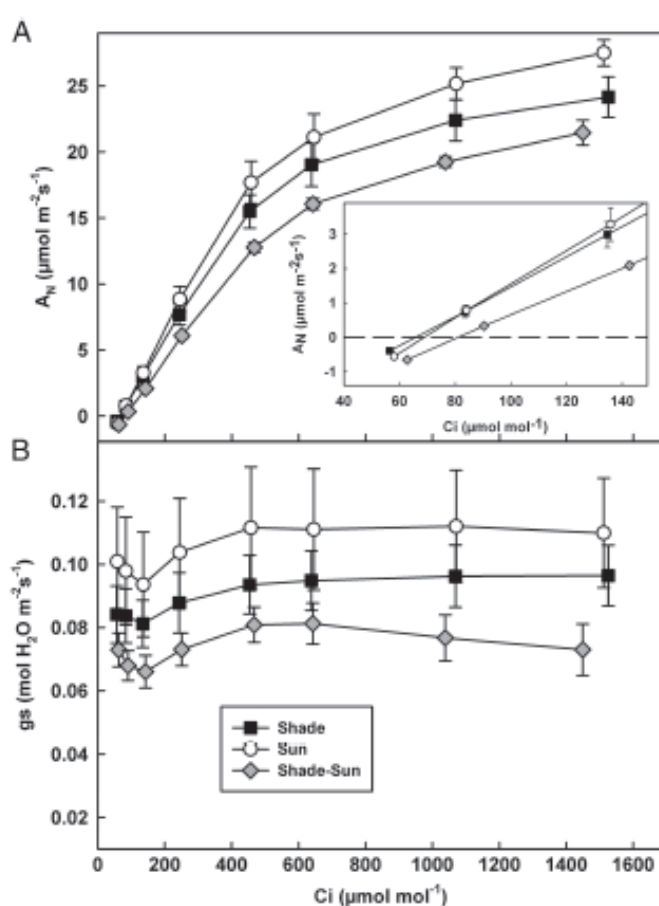


Fig. 6. Photosynthetic net carbon assimilation (A_N) and stomatal conductance to water vapour (g_s) of *S. alpina* leaves at the end of the experiment. Shade leaves are represented by black squares, sun leaves by white circles and leaves transferred from shade to sun are shown as grey diamonds, all as a function of internal CO_2 partial pressure C_i . Insert: expansion of the scale at low C_i . Mean values with standard errors of experiments with three independent sun plants and four independent shade and shade-sun transferred plants are shown.

Discussion

Photosynthesis in shade and sun leaves

Photosynthetic light and C_i curves of *S. alpina* leaves did not indicate pronounced shade or sun acclimation, contrary to other light acclimation parameters such as the DA_{375} , LMA, the $\text{CHL}a/b$ ratio and the $\text{CHL}/\text{carotenoid}$ ratio (Laureau et al. 2015). Nevertheless, sun leaves had a slightly higher photosynthetic activity than shade leaves under all investigated conditions. *S. alpina* plants were investigated in their natural environment and shade leaves received fluctuating light, peaking at a PFD of $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, and the mean hourly PFDs could be as high as $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. In *Arabidopsis* leaves fluctuating light regimes can increase photosynthetic activity under certain conditions, compared to leaves grown under constant low light (Yin and Johnson 2000, Violet-Chabrand et al. 2017), with

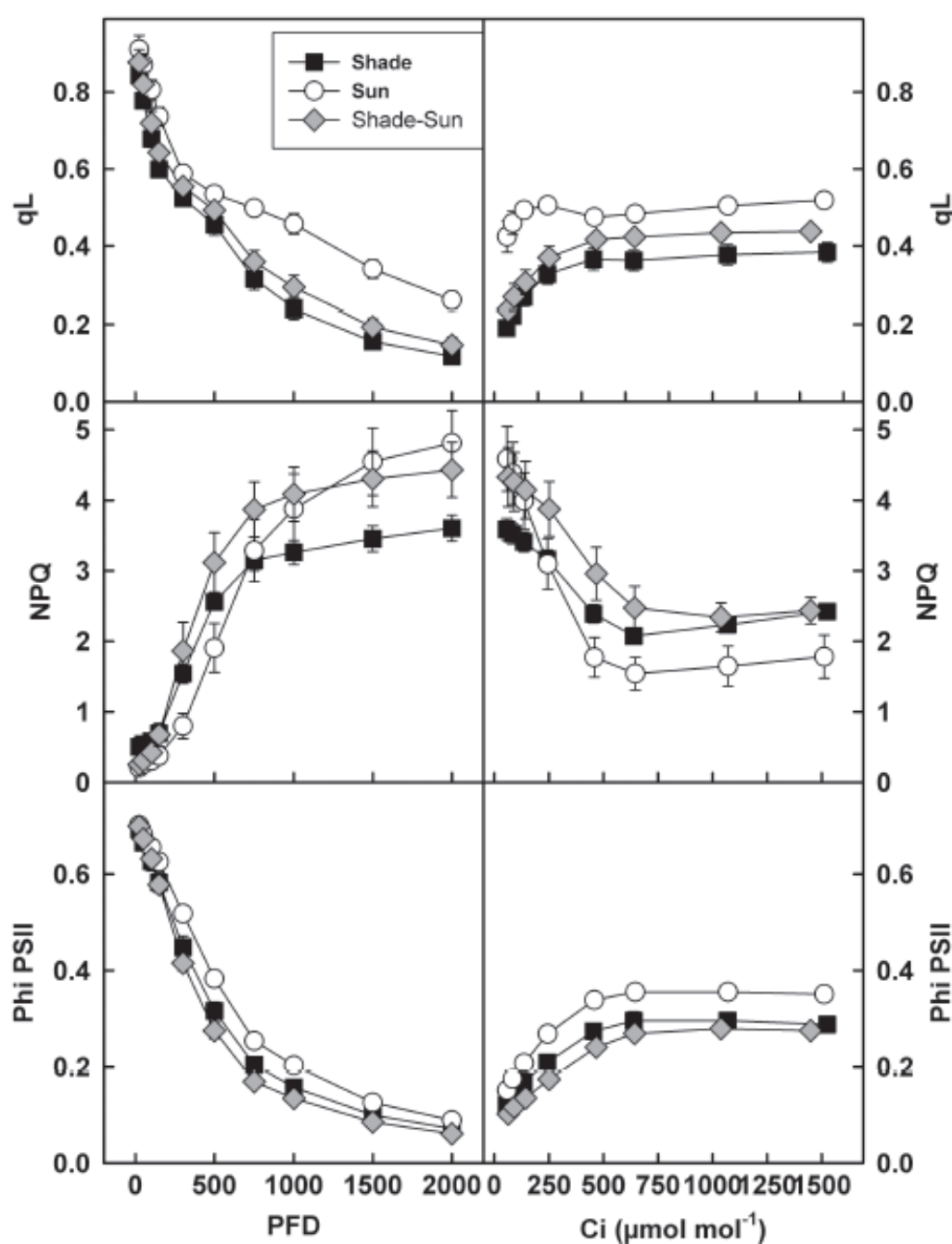


Fig. 7. Fluorescence parameters q_L , NPQ and Φ_{PSII} in leaves of *S. alpina*. Sun leaves are represented by white circles, shade leaves by black squares and leaves transferred from shade to sun by grey diamonds, all at end of the experiment as a function of PFD and as a function of C_i . Mean values with standard errors of experiments with three independent sun plants and four independent shade and shade-sun transferred plants are shown.

a reversible increase in UV absorbance (Moriconi et al. 2018). Therefore, fluctuating light could also ameliorate carbon assimilation in *S. alpina* shade leaves. In other species, photosynthesis differed more between shade and sun leaves cultivated under similar light intensities or even with a smaller difference between high and low mean light intensity (Murchie et al. 2002, Huang et al. 2014, Vialet-Chabrand et al. 2017).

However, striking differences between shade and sun leaves were observed using CHL fluorescence, confirming measurements in other species (Murchie et al. 2002, Bailey et al. 2004, Matsubara et al. 2012,

Zivcak et al. 2014). The q_L and Φ_{PSII} were lower in shade leaves than sun leaves at all PFDs and C_i values tested (Fig. 2). This suggests a higher fraction of reduced Q_A and less linear electron transport at PSII (Baker 2008) in shade leaves compared to sun leaves. The NPQ depends on the formation of the proton gradient and is correlated to heat emission in PSII, which is currently interpreted as protection against overexcitation in high light (Ruban 2016). The NPQ was higher at low C_i and high PFD in sun leaves, indicating a higher photoprotection capacity than in shade leaves. High non-photochemical quenching capacities of *S. alpina* leaves were previously shown to be sensitive to DTT

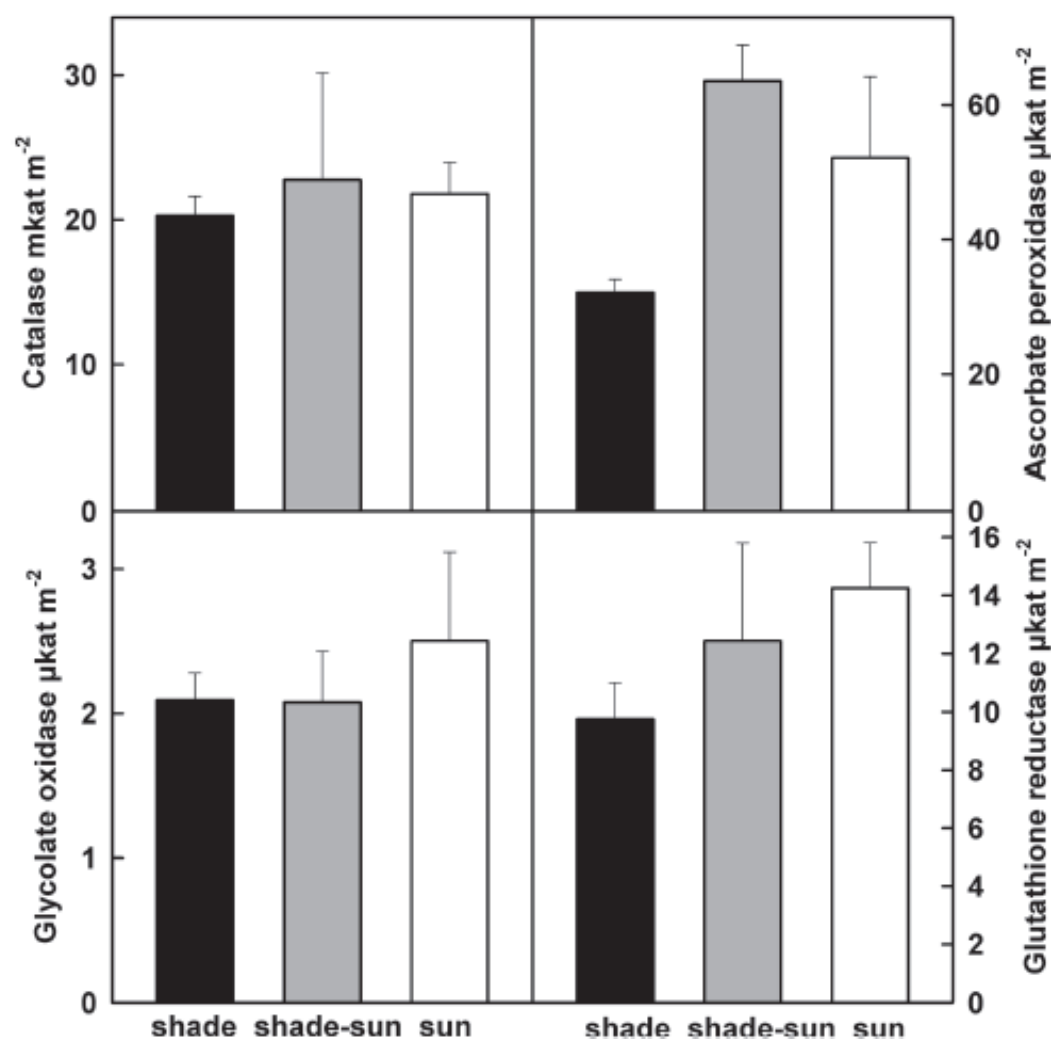


Fig. 8. Activity of catalase, glycolate oxidase, cytoplasmic ascorbate peroxidase and glutathione reductase at the end of the experiment in *S. alpina* shade (S), sun (L) or shade-sun (SL) transferred leaves. The increase of APX in SL leaves is statistically significant at $P < 0.05$ (Students *t*-test). Mean values with standard errors of experiments with four independent leaves are shown.

inhibition and correlated to zeaxanthin synthesis (Streb et al. 1998). The lower CHL/carotenoid ratio for sun leaves (Laureau et al. 2015) therefore suggests a higher xanthophyll cycle mediated NPQ in sun leaves compared to shade leaves. The higher NPQ at low PFD in shade leaves compared to sun leaves suggests induction of NPQ at a low PFD (Fig. 2), consistent with limitations of carbon assimilation at lower light intensity (Walters 2005). In barley, light growth intensity between shade and sun leaves differed more than in *S. alpina* leaves in this study, but fluorescence parameters differed less (Zivcak et al. 2014).

Dynamic acclimation of *S. alpina* leaves

Dynamic acclimation of photosynthesis to higher light was demonstrated in several shade grown leaves under controlled laboratory conditions (Bauer and Thöni 1988, Oguchi et al. 2003, Amiard et al. 2005, Murchie et al. 2005, Athanasiou et al. 2010). Dynamic acclimation of *S. alpina* leaves is indicated by a strong increase in epidermal flavonoid content after shade-sun

transfer (Laureau et al. 2015 and Table 1). In contrast, the CHL index markedly decreased, lowering the CHL/flavonoid ratio to values similar to pure sun leaves. A low CHL/flavonoid ratio is a typical signature of sun leaves (Meyer et al. 2006) and indicates a relocation of carbon sources for the synthesis of flavonoids rather than CHL. This was confirmed in *S. alpina*, where between the start and the end of the experiment, the CHL/flavonoid ratio for shade leaves increased, whereas it decreased for sun and shade-sun transferred leaves (Table 1).

Shade-sun transfer influenced the anatomy of *S. alpina* leaves, as shown by an increase in LMA, an increase in leaf thickness, mainly caused by increased cell size of palisade and spongy mesophyll, and an increase in stomatal density (Table 4). Similar anatomical acclimation after shade-sun transfer was observed in several plant species (Bauer and Thöni 1988, Oguchi et al. 2003, Amiard et al. 2005), but was not a general phenomenon (Sims and Percy 1992, Murchie et al. 2005, Avalos and Mulkey 2014). All this suggests that dynamic acclimation to sun conditions occurs in *S. alpina* shade leaves. The increase in leaf thickness, observed in *Hedera*

Table 5. Leaf number (leaf no.) on the first and last days of the investigation in sun, shade or shade-sun transferred plants investigated over two consecutive years, 2016 and 2017. The number of senescent leaves (at least 25% CHL loss), dead leaves (no CHL) and newly synthesised leaves (new leaves) of the investigated *S. alpina* plants after a period of at least 30 days (the number of days is indicated) is shown. The number of independent investigated plants (Plant No.) under each condition is indicated.

Year	Condition	Days	Plant no.	Leaf no. day 1	Leaf no. last day	Senescent leaves	Dead leaves	New leaves
2016	Sun	36	4	20	23	3	6	9
2016	Shade	39	5	23	24	2	3	4
2016	Shade-sun	36	5	20	8	3	14	2
2017	Sun	30	5	14	17	0	3	6
2017	Shade	30-35	8	17	18	0	0	1
2017	Shade-sun	30-31	9	26	24	0	4	2

helix, *Chenopodium album* and *Valeriana jatamansi* after shade-sun transfer, was proposed as a condition for increasing photosynthetic activity (Bauer and Thöni 1988, Oguchi et al. 2003, Pandey and Kushwaha 2005). In shade-sun transferred leaves of *S. alpina*, photosynthetic activity declined under all conditions compared to shade leaves. This correlates to a decline in the *Fv/Fm* ratio, indicating photoinhibition of photosynthesis after shade-sun transfer (Laureau et al. 2015 and unpublished results). Similar observations were made in deep-grown tropical shade leaves of six tree species transferred to higher light (Quevedo-Rojas et al. 2018) and can occur generally in species transferred to a high light environment, in particular if high light is combined with other stress factors (Allahverdiyeva and Aro 2012), such as alpine conditions.

Remarkably, the stomatal density increased in shade-sun transferred leaves compared to shade leaves. A higher stomatal density in sun compared to shade grown leaves was widely reported (Casson and Gray 2007, Gerardin et al. 2018, Dörken and Lepetit 2018, Quevedo-Rojas et al. 2018) and is usually accompanied by higher stomatal conductance. This was not the case in shade-sun transferred *S. alpina* leaves, where stomatal conductance to water vapour remained lowest. Since carbon assimilation remained lowest at all *Ci* concentrations, stomatal conductance does not limit carbon assimilation in shade-sun transferred leaves.

If photoinhibition of PSII prevents an acclimation of carbon assimilation in shade-sun transferred *S. alpina* leaves, one would also expect a decrease in Φ PSII, which is an indicator of linear electron transport (Baker 2008). In shade-sun transferred leaves, Φ PSII and qL did not differ from those of shade leaves. In contrast, maximum NPQ values increased in shade-sun transferred leaves compared to shade leaves but the NPQ kinetic as a function of PFD and as a function of *Ci* followed the pattern of shade leaves, and not sun leaves. If PSII

photoinhibition limits carbon assimilation in shade-sun transferred leaves, one would expect a slower induction of NPQ because of a delayed formation of the proton gradient. In conclusion, carbon assimilation in shade-sun transferred leaves may in fact be limited by Rubisco content or carbon export (Bauer and Thöni 1988, Yin and Johnson 2000, Oguchi et al. 2003, Amiard et al. 2005).

Differences in antioxidative protection

Sun leaves have higher capacities of antioxidative protection than shade leaves (Grace and Logan 1996), as was demonstrated for ascorbate peroxidase and glutathione reductase in *S. alpina* leaves (Laureau et al. 2015 and Fig. 8). *S. alpina* leaves generally contain a very strong antioxidative protection system compared to other alpine and non-alpine plant species (Streb et al. 1998, Laureau et al. 2011, Streb and Cornic 2012). A further increase in ascorbate peroxidase and glutathione reductase, as well as flavonoid levels, were observed in shade-sun transferred leaves and indicated increased oxidative stress after shade-sun transfer. Flavonoids also act as antioxidants alongside their UV screening capacity (Agati et al. 2012).

Leaf turnover in shade, sun and shade-sun transferred leaves

Acclimation of antioxidative protection and anatomical adjustments were insufficient in alleviating photoinhibition in shade-sun transferred leaves (Laureau et al. 2015), and the mortality of these leaves was also higher than in shade or sun leaves. Furthermore, dead leaves were entirely replaced for shade and sun leaves, but not in shade-sun transferred leaves. This was most evident in the year 2016, where general alpine stress was combined with insufficient water supply and led to the mortality of some plants.

Conclusion

This study investigated a species which received very high PFDs during growth, far exceeding those used in most previous studies, especially for shade plants grown at low altitude or under controlled conditions (Bauer and Thöni 1988, Sims and Pearcy 1992, Yin and Johnson 2000, Bailey et al. 2001, Oguchi et al. 2003, Amiard et al. 2005, Murchie et al. 2005, Priault et al. 2006, Athanasiou et al. 2010, Avalos and Mulkey 2014, Yamori 2016, Quevedo-Rojas et al. 2018). *S. alpina* shade leaves may therefore correspond more to a typical sun leaf investigated by other authors. This is shown by the relatively small difference in carbon assimilation between sun and shade leaves, which also had almost the same light saturation point. Experiments using higher PFDs, comparable to those received by *S. alpina*, such as field grown rice (Murchie et al. 2002), or the Himalaya species *Valeriana jatamansi* (Pandey and Kushwaha 2005), did not receive high PFD sunflecks. This suggests that sunflecks may upregulate photosynthesis in *S. alpina* shade leaves. However, shade leaves differed from sun leaves with significant differences in leaf anatomy and chlorophyll fluorescence. Leaf anatomy was changed in shade-sun transferred leaves receiving continuously higher PFDs, thus approaching characteristics of sun leaves, while photosynthesis was impaired. This correlates to a higher NPQ capacity, antioxidant protection, and light attenuation by flavonoids, suggesting that *S. alpina* responded to light stress. All these acclimation responses were insufficient in avoiding photoinhibition and irreversible leaf damage.

Author contributions

S.M. and P.S. designed the experiments and wrote the manuscript. All authors contributed to the measurements. X.B. also contributed to technical adjustments in microscopy.

Acknowledgements – We thank the alpine research station of the Lautaret for accommodation and perfect research facilities. Caroline Daniel, Zoran Cerovic and Gwendal Latouche (ESE, Ecology Systematic Evolution, Orsay) are acknowledged for their help during optical measurements and the support of the Dualex. We thank the ImagoSeine platform (Institut Jacques Monod, University Paris, France) for providing the microscope and Deki Fourcin for correcting the English language.

References

Agati G, Tattini M (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol* 186: 786–793
Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci* 196: 67–76

Allahverdiyeva Y, Aro E-M (2012) Photosynthetic responses of plants to excess light mechanisms and conditions for photoinhibition, excess energy dissipation and repair. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD (eds) *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*, Vol. 34. Springer, Heidelberg, pp 275–297
Amiard V, Mueh KE, Demmig-Adams B, Ebbert V, Turgeon R, Adams WW III (2005) Anatomical and photosynthetic acclimation to the light environment in species with differing mechanisms of phloem loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12968–12973
Anderson JM, Osmond CB (1987) Shade-sun responses: Compromises between acclimation and photoinhibition. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ (eds) *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp 1–38
Athanasiou K, Dyson BC, Webster RE, Johnson GN (2010) Dynamic acclimation of photosynthesis increases plant fitness in changing environments. *Plant Physiol* 152: 366–373
Avalos G, Mulkey S (2014) Photosynthetic and morphological acclimation of seedlings of tropical lianas to changes in the light environment. *Am J Bot* 101: 2088–2096
Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213: 794–801
Bailey S, Horton P, Walters RG (2004) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta* 218: 793–802
Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Ann Rev Plant Biol* 59: 89–113
Bauer H, Thöni W (1988) Photosynthetic light acclimation in fully developed leaves of the juvenile and adult life phases of *Hedera helix*. *Physiol Plant* 73: 31–37
Casson S, Gray J (2007) Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytol* 178: 9–23
Cerovic ZG, Masoumier G, Ben-Ghozlen N, Latouche G (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol Plant* 146: 251–260
Dörken VM, Lepetit B (2018) Morpho-anatomical and physiological differences between sun and shade leaves in *Abies alba* Mill. (Pinaceae, Coniferales): a combined approach. *Plant Cell Environ* 41: 1683–1697
Gerardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot* 153: 188–197
Grace SC, Logan BA (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol* 112: 1631–1640

- Huang W, Zhang S-B, Hu H (2014) Sun leaves up-regulate the photorespiratory pathway to maintain a high rate of CO₂ assimilation in tobacco. *Front Plant Sci* 5: 1–8
- Laureau C, Bligny R, Streb P (2011) The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Physiol Plant* 143: 246–260
- Laureau C, De Paepe R, Latouche G, Moreno-Chacón M, Finazzi G, Kuntz M, Cornic G, Streb P (2013) Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* L. *Plant Cell Environ* 36: 1296–1310
- Laureau C, Meyer S, Baudin X, Huignard C, Streb P (2015) *In vivo* epidermal UV-A absorbance is induced by sunlight and protects *Soldanella alpina* leaves from photoinhibition. *Funct Plant Biol* 42: 599–608
- Matsubara S, Förster B, Waterman M, Robinson SA, Pogson BJ, Gunning B, Osmond B (2012) From ecophysiology to phenomics: some implications of photoprotection and shade-sun acclimation in situ for dynamics of thylakoids in vitro. *Phil Trans Royal Soc B* 367: 3503–3514
- Meyer S, Cerovic ZG, Goulas Y, Montpied P, Demotes-Mainkard S, Bidet LPR, 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 Environ* 29: 1338–1348
- Moriconi V, Binkert M, Costigliolo C, Sellaro R, Ulm R, Casal JJ (2018) Perception of sunflecks by the UV-B photoreceptor UV RESISTANCE LOCUS8. *Plant Physiol* 177: 75–81
- Murchie EH, Hubbart S, Chen Y, Peng S, Horton P (2002) Acclimation of rice photosynthesis to irradiance under field conditions. *Plant Physiol* 130: 1999–2010
- Murchie EH, Hubbart S, Peng S, Horton P (2005) Acclimation of photosynthesis to high irradiance in rice: gene expression and interactions with leaf development. *J Exp Bot* 56: 449–460
- Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T (2003) Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? *Plant Cell Environ* 26: 505–512
- Pandey S, Kushwaha R (2005) Leaf anatomy and photosynthetic acclimation in *Valeriana jatamansi* grown under high and low irradiance. *Photosynthetica* 43: 85–90
- Priault P, Fresneau C, Noctor G, DePaepe R, Cornic G, Streb P (2006) The mitochondrial CMSII mutation of *Nicotiana sylvestris* impairs adjustment of photosynthetic carbon assimilation to higher growth irradiance. *J Exp Bot* 57: 2075–2085
- Quevedo-Rojas A, Garcia-Nunez C, Jerez-Rico M, Jaimez R, Schwarzkopf T (2018) Leaf acclimation strategies to contrasting light conditions in saplings of different shade-tolerance in a tropical cloud forest. *Funct Plant Biol* 45: 968–982
- Ruban AV (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170: 1903–1916
- Sims DA, Pearcy RW (1992) Response of leaf anatomy and photosynthetic capacity in *Alocasia macrorrhiza* (Araceae) to transfer from low to high light. *Am J Bot* 79: 449–455
- Streb P, Cornic G (2012) Photosynthesis and antioxidative protection in alpine herbs. In: Lütz C (ed) *Plants in Alpine Regions. Cell Physiology of Adaptation and Survival Strategies*. Springer, Wien New York, pp 75–97
- Streb P, Shang W, Feierabend J, Bligny R (1998) Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207: 313–324
- Takahashi S, Milward SE, Yamori W, Evans JR, Hillier W, Badger MR (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiol* 153: 988–993
- Vialet-Chabrand S, Matthews JSA, Simkin AJ, Raines CA, Lawson T (2017) Importance of fluctuations in light on plant photosynthetic acclimation. *Plant Physiol* 173: 2163–2179
- Walters RG (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* 56: 435–447
- Yamori W (2016) Photosynthetic response to fluctuating environments and photoprotective strategies under abiotic stress. *J Plant Res* 129: 379–395
- Yin Z-H, Johnson GN (2000) Photosynthetic acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. *Photosynth Res* 63: 97–107
- Zivcak M, Brestic M, Kalaji HM, Govindjee (2014) Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess light? *Photosynth Res* 119: 339–354

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Data S1. Supporting Information.

Fig. S1. Net carbon assimilation as a function of PFD in shade and sun leaves at the start of the experiment

Fig. S2. Net carbon assimilation as a function of *Ci* in shade and sun leaves at the start of the experiment

Take home message:

- Au cours de la période de végétation, les feuilles de *S.alpina* sont progressivement ombragées par les plantes alentour. A la fin de la période de végétation, à cause des pâturages ou de la sénescence du reste de la végétation, elles se retrouvent confrontées à des intensités importantes.
- En réponse à cette augmentation de l'intensité lumineuse, on observe une augmentation de l'épaisseur des feuilles de *S.alpina*, par le biais de l'augmentation du parenchyme palissadique et du parenchyme lacuneux.
- Les feuilles de *S.alpina* ont donc une anatomie flexible et ont une réponse à long terme aux stress rencontré lors du passage de l'été à l'automne.
- La photosynthèse des feuilles de *S.alpina* en revanche est loin d'être aussi flexible.
- Pour compenser l'absence d'acclimatation de la photosynthèse, on observe une augmentation des capacités du système antioxydant avec une augmentation des activités de la catalase, de l'ascorbate peroxydase et de la glutathione reductase en plus de l'augmentation des flavonoïdes.

Les feuilles de *S.alpina* sont donc capables de répondre aux stress qu'elles rencontrent lors des changements de saison à courts terme par le biais d'une photoinhibition, à moyen terme grâce à l'induction des flavonoïdes et à l'augmentation des capacités du système antioxydant et à long terme grâce à des changements morphologiques. En revanche on n'observe pas d'acclimatation de la photosynthèse.

En conséquence de ce manque de flexibilité de la photosynthèse, la majorité des feuilles transférées de l'ombre à la lumière ne survivent pas jusqu'à l'hiver. Seules les feuilles acclimatées à la lumière sont capable de survivre à l'hiver.

Au vu du manque de flexibilité de la photosynthèse, on s'est demandé comment les feuilles s'acclimataient et survivaient aux variations brutales lors de la fonte des neiges.

Chapitre 3 :
Méthode de détermination du flux d'électron excédentaire

La méthodologie utilisée pour le calcul des électrons en excès étant originale, un certain nombre de contrôles ont donc été effectués afin d'aboutir à la méthode la plus précise. Cette étude est éprouvée en prenant en exemple les résultats et recalculs obtenus sur les jeunes feuilles nouvellement formées de *Soldanella alpina* ainsi que sur les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Eutrema salsuginea*.

Les premières mesures d'assimilations et de flux électroniques totaux ($J_{t_{Licor}}$) en fonction de l'intensité lumineuse (PFD) et de la concentration interne en CO_2 sont obtenues via le LICOR équipé d'une tête de mesure de la fluorescence chlorophyllienne qui permet notamment de connaître le $\phi PSII$ à partir duquel est recalculé le flux électronique total selon le calcul suivant (Krall and Edwards, 1992) :

$$J_{t_{Licor}} = 0,5 \times \text{Absorbance de la feuille} \times \phi PSII \times PFD$$

Dans ce calcul, la valeur de 0,5 correspond à la fraction de quantas d'énergie absorbés par le PSII. On considère en effet que chez les plantes en C3, chaque photosystème absorbe 50% de l'énergie captée.

L'absorbance des feuilles est fixée par le Licor à une valeur arbitraire de 0,8. Pour la suite, dans les recalculs, on utilisera donc une absorbance foliaire mesurée à l'aide d'une sphère intégrative permettant de connaître avec précision les absorbances foliaires des feuilles étudiées. La lumière utilisée par la Licor est composée de 10% de lumière bleue dont les valeurs de longueur d'ondes sont comprises entre 430 et 520 nm et de 90% de lumière rouge dont les valeurs de longueur d'ondes sont comprises entre 590 et 670nm. On prendra donc seulement en compte l'absorbance des feuilles entre ses longueurs d'ondes.

Dans le cas de *Soldanella alpina*, l'absorption dans le bleu est de 94% contre 88,5% dans le rouge soit une absorbance des feuilles de 89,05%.

Les mesures sont à chaque fois effectuées dans une atmosphère normale contenant de l'oxygène et dans une atmosphère dépourvue d'oxygène (N_2). Dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, l'oxygène en temps qu'accepteur de la Rubisco pour la photorespiration ou en temps qu'accepteur des électrons n'existe pas, on a ainsi seulement le flux allant à la photosynthèse.(Cornic and Briantais, 1991)

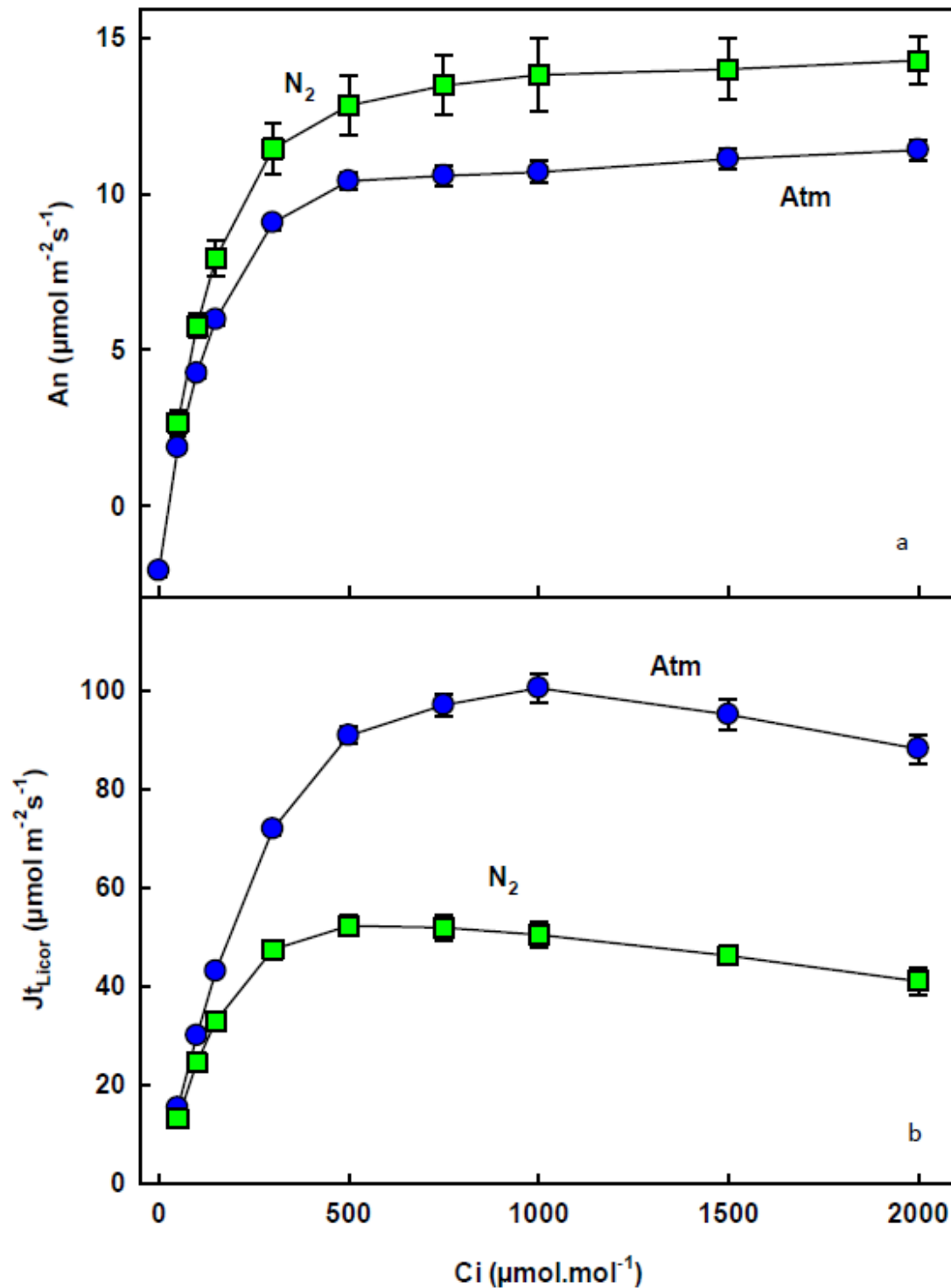


Figure 44: Variation de l'assimilation du CO₂ et de l' Jt_{Licor} calculé selon (Krall and Edwards, 1992) en fonction de l'intensité lumineuse chez les feuilles neuves de *Soldanella alpina* (Atm : $n=13$, N_2 : $n=4$)

On constate que l'assimilation du CO₂ - donc la photosynthèse - augmente en fonction de l'intensité lumineuse jusqu'à parvenir à un pallier au alentour de $750 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. L'assimilation est plus élevée dans une atmosphère dépourvue d'oxygène en raison de la suppression de la photorespiration dans cette condition (figure 44a).

Le Jt_{Licor} suit la même évolution que la photosynthèse c'est-à-dire que l'on observe une augmentation du Jt_{Licor} en fonction de l'intensité lumineuse. En revanche le flux d'électron total n'arrive pas à un plateau, contrairement à la photosynthèse, mais à un maximum à $1000 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les plantes mesurées dans une atmosphère normale et à $500 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans N_2 . On remarque également que bien que la photosynthèse soit plus importante dans une atmosphère dépourvue d'oxygène le flux électronique total est plus faible dans une atmosphère sans oxygène (figure 44b).

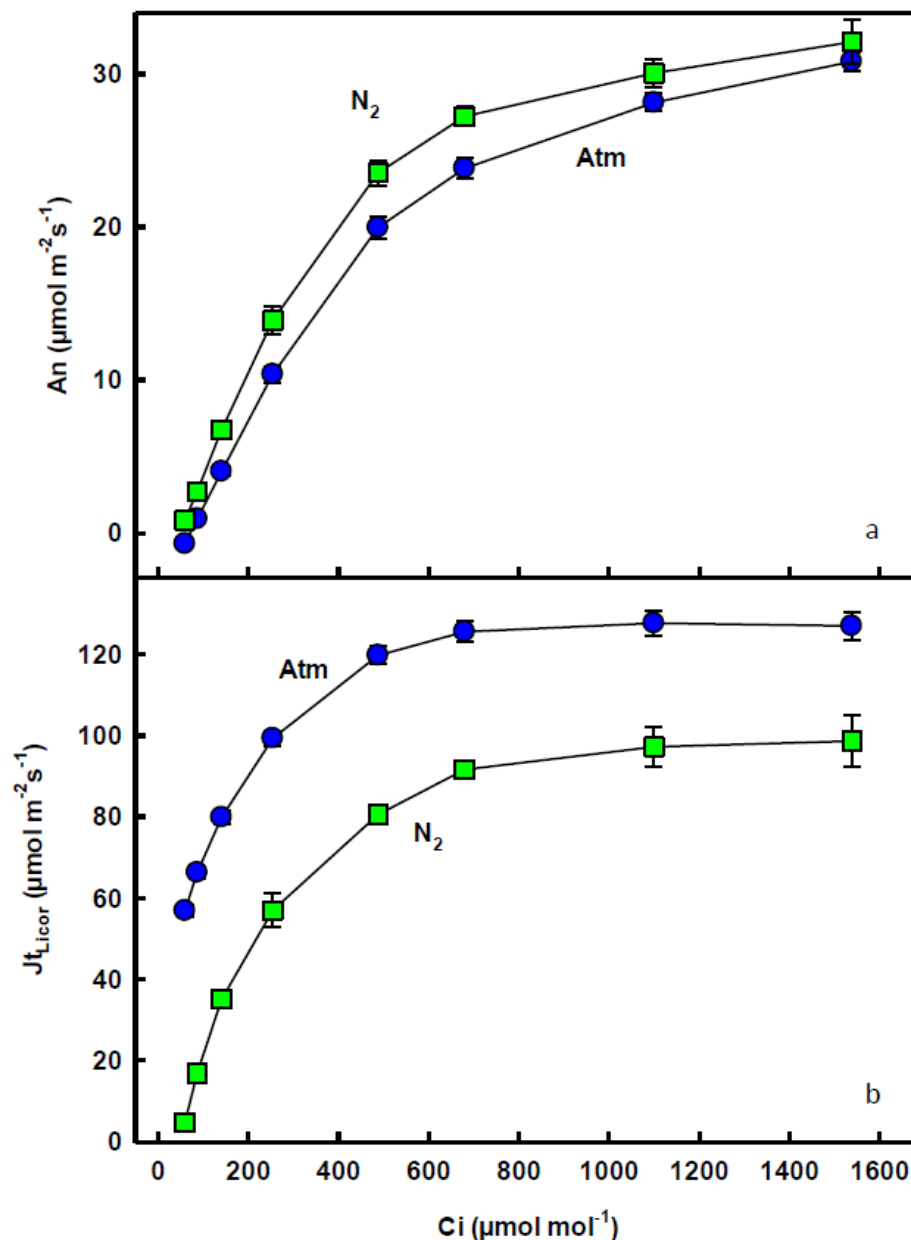


Figure 45: Variation de l'assimilation du CO_2 et de l' $\text{ETR}_{\text{Licor}}$ calculé selon (Krall and Edwards, 1992) en fonction de la concentration interne en CO_2 chez les feuilles neuves de *Soldanella alpina* (Atm : $n=12$, N_2 : $n=5$)

L'assimilation du CO_2 augmente également en fonction de la concentration interne en CO_2 (figure 45.a). La photosynthèse est en revanche légèrement plus faible dans une atmosphère normale en comparaison avec une atmosphère sans oxygène, sauf à une

concentration en CO₂ élevée. Il y a donc de la photorespiration mais la photorespiration est supprimée si la quantité de CO₂ interne est élevée (figure 45.a).

Le flux électronique total augmente également en fonction de la concentration interne en CO₂ jusqu'à arriver à un pallier vers 700 μmol.mol⁻¹. Dans la mesure où il n'y a pas de photorespiration quand la concentration interne en CO₂ est élevée, on s'attendrait à ce que le flux électronique total à forte concentration interne en CO₂ soit similaire, que la mesure ait été faite dans l'azote ou avec une atmosphère normale. Mais ce n'est pas ce qui est observé. En effet, il y a une différence de 40 μmol électrons.m⁻².s⁻¹ environ entre le J_{t_{Licor}} total mesuré à forte concentration interne en CO₂ dans l'azote et celui mesuré dans une atmosphère normale. Ces 40 μmol électrons.m⁻².s⁻¹ environ ne vont donc pas, à priori, à la photorespiration ou à la photosynthèse mais existent tout de même (figure 45.b).

Les flux électroniques allant à la photosynthèse (J_c) ou à la photorespiration (J_o) peuvent être calculés selon (Epron *et al.*, 1995) à partir du flux électronique total (J_{t_{Licor}}), sous le postulat que les électrons sont seulement distribués à la carboxylation ou l'oxygénation de la Rubisco. Ainsi :

$$J_c = \frac{1}{3}(J_t + 8(A_n + R_L))$$

$$J_o = \frac{2}{3}(J_t - 4(A_n + R_L))$$

Une fois calculé (figure 46) on remarque, comme pour la photosynthèse, que le flux électronique allant à la carboxylation de la Rubisco augmente avec l'intensité lumineuse jusqu'à arriver à un plateau vers 750 μmol de photon.m⁻².s⁻¹ correspondant à 65 μmol électrons.m⁻².s⁻¹ environ. Hors l'assimilation du CO₂ pour cette condition est de 12 μmol de CO₂.m⁻².s⁻¹. Sous le postulat que 4 électrons sont nécessaires à la fixation d'une molécule de CO₂, alors le flux électronique correspondant à la photosynthèse devrait être de 48 μmol électrons.m⁻².s⁻¹. On a donc soit une proportion d'électrons en excès soit une refixation importante du CO₂ produit par la photorespiration. En effet en cas de refixation du CO₂ produit par la photorespiration, on aurait un J_o d'environ 32 μmol d'électrons.m⁻².s⁻¹ soit environ 8 glycolates de produit, donnant 4 molécules de CO₂ au total. Si ces 4 molécules de CO₂ sont refixées par la photosynthèse alors cela correspond à un flux de 16 électrons supplémentaires ce qui nous ramène bien aux 65 μmol électrons.m⁻².s⁻¹.

Le flux électronique allant à l'oxygénation de la Rubisco augmente également en fonction de l'intensité lumineuse jusqu'à un maximum à 1000 μmol de photons.m⁻².s⁻¹ et diminue ensuite ce qui est étonnant dans la mesure où on ne recense pas dans la littérature d'inhibition par la lumière de la photorespiration.

Le flux électronique allant à l'oxygénation comme celui allant à la carboxylation de la Rubisco varient également en fonction de la pression partielle en CO₂. Le flux allant à la

carboxylation augmente avec l'augmentation de la pression partielle en CO₂ jusqu'à atteindre à un plateau vers 1100 μmol.mol⁻¹. Le maximum atteint au plateau est de 120 μmol d'électrons.m⁻².s⁻¹, ce qui est cohérent avec la mesure d'assimilation du CO₂ trouvées sur la figure 46. Cependant à faibles pressions partielles en CO₂, J_c ne correspond pas. Si on prend pour exemple 250 μmol.m⁻¹, on note que J_c est d'environ 60 μmol électrons.m⁻².s⁻¹ alors que la photosynthèse est de 10 μmol de CO₂.m⁻².s⁻¹ ce qui ferait un flux à la carboxylation de 40 μmol électrons.m⁻².s⁻¹, soit une différence de 20 μmol électrons.m⁻².s⁻¹. Comme expliqué plus haut, il se peut que ces électrons correspondent à un flux électronique excédentaire mais il se peut également que cela corresponde seulement aux électrons nécessaires à la refixation du CO₂ produit par la photorespiration.

J_o diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration interne en CO₂ et à fortes concentrations internes en CO₂ J_o est nul ce qui correspond à l'observation faite précédemment (figure n°45) d'une inhibition de la photorespiration à fortes concentrations en CO₂.

A la vue des résultats du recalcul des flux électroniques et des résultats calculés selon (Krall and Edwards, 1992), on peut conclure à une photorespiration très forte chez *Soldanella alpina* qui consommeraient les 2/5^{ème} du flux électronique total sous conditions atmosphérique à 750 μmol de photons.m⁻².s⁻¹.

Du fait de l'épaisseur des feuilles, relativement importante chez *Soldanella alpina* (Talhouët *et al.*; Laureau *et al.*, 2015b; Talhouët *et al.*, 2019) qui possède jusqu'à 3 couches de parenchyme palissadique, et du fait que la mesure du PSII est limitée aux premières couches de la feuille seulement (Lichtenberg *et al.*, 2017), on peut se demander dans quelles mesures le calcul selon (Krall and Edwards, 1992) du flux électronique total est correct. Pour les mêmes raisons, on pourrait également raisonnablement douter des résultats donnés par (Epron *et al.*, 1995) pour les flux allant respectivement à la carboxylation et à l'oxygénation de la Rubisco bien que sous l'hypothèse d'une photorespiration forte et d'une refixation importante du CO₂ produit par la photorespiration, cette méthode nous donne des résultats tout à fait cohérents.

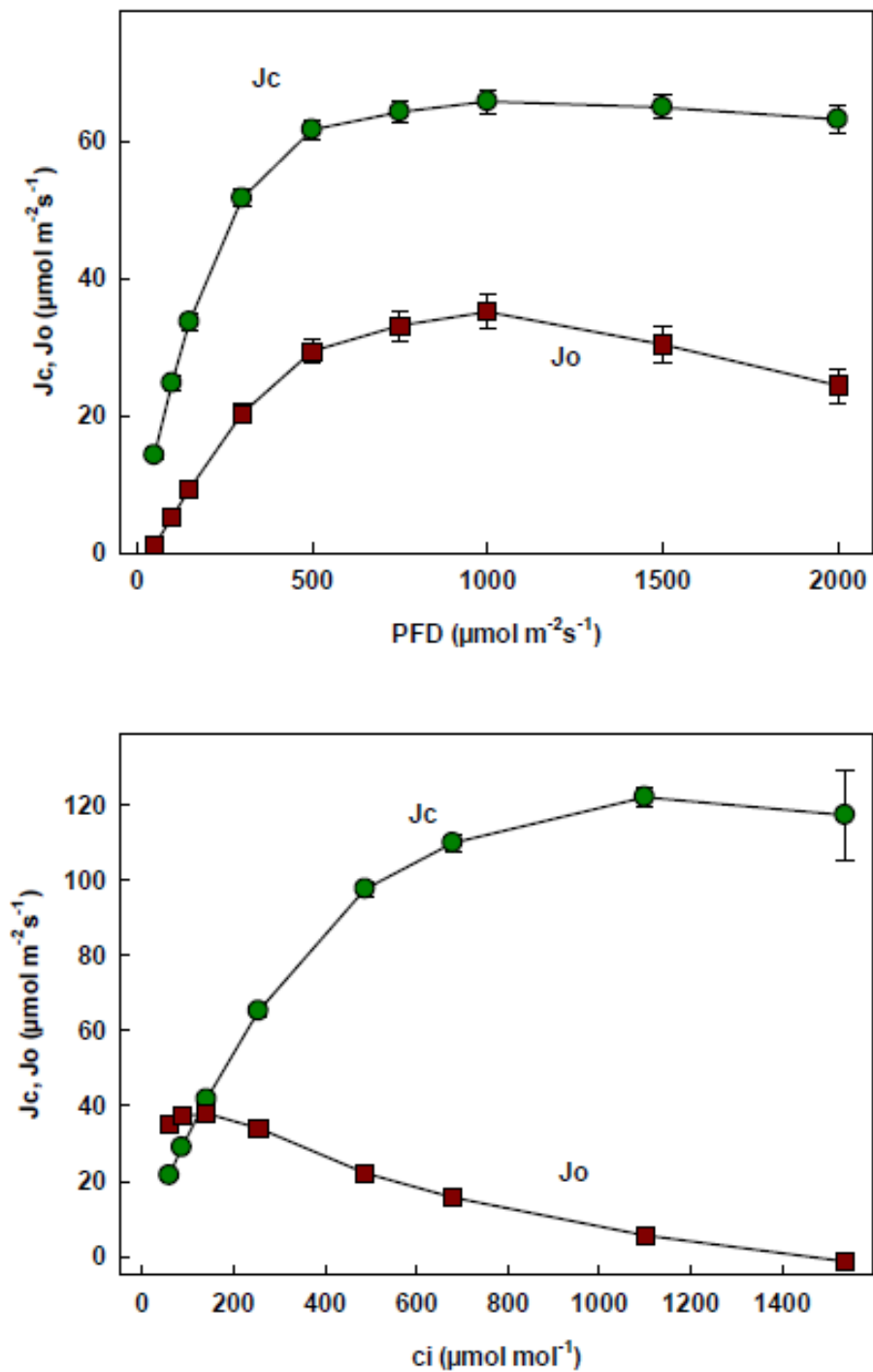


Figure 46: variation des flux électroniques calculé selon (Epron *et al.*, 1995) alloué à l'oxygénation et de la carboxylation de la rubisco chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* mesuré sous atmosphère normale (n=12)

Il existe une méthode simple pour vérifier le transport électronique calculé selon (Krall and Edwards, 1992) à l'aide des données récoltées par le Licor. En effet on peut s'attendre à ce que dans une atmosphère composée d'azote, si on soustrait au $J_{t_{\text{Licor}}}$ la quantité d'électrons attribué à la photosynthèse corrigée par la respiration à la lumière (cf Matériel et

méthode), on obtienne un flux électronique restant nul (dans la mesure où l'assimilation du CO_2 ne correspond qu'à ces deux procédés en l'absence de photorespiration).

Ainsi, on a calculé $Jt_{\text{Licor}} - 4 \times (A_N - R_L)$ et obtenu les résultats suivants :

Le flux électronique restant une fois qu'a été retranché au flux électronique total celui attribué à la photosynthèse et à la respiration n'est pas nul. Que ce soit pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse ou en fonction de la concentration interne en CO_2 , le nombre d'électrons restant diminue jusqu'à atteindre des valeurs négatives de -20 à -40 $\mu\text{mol électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans les conditions les plus extrêmes.

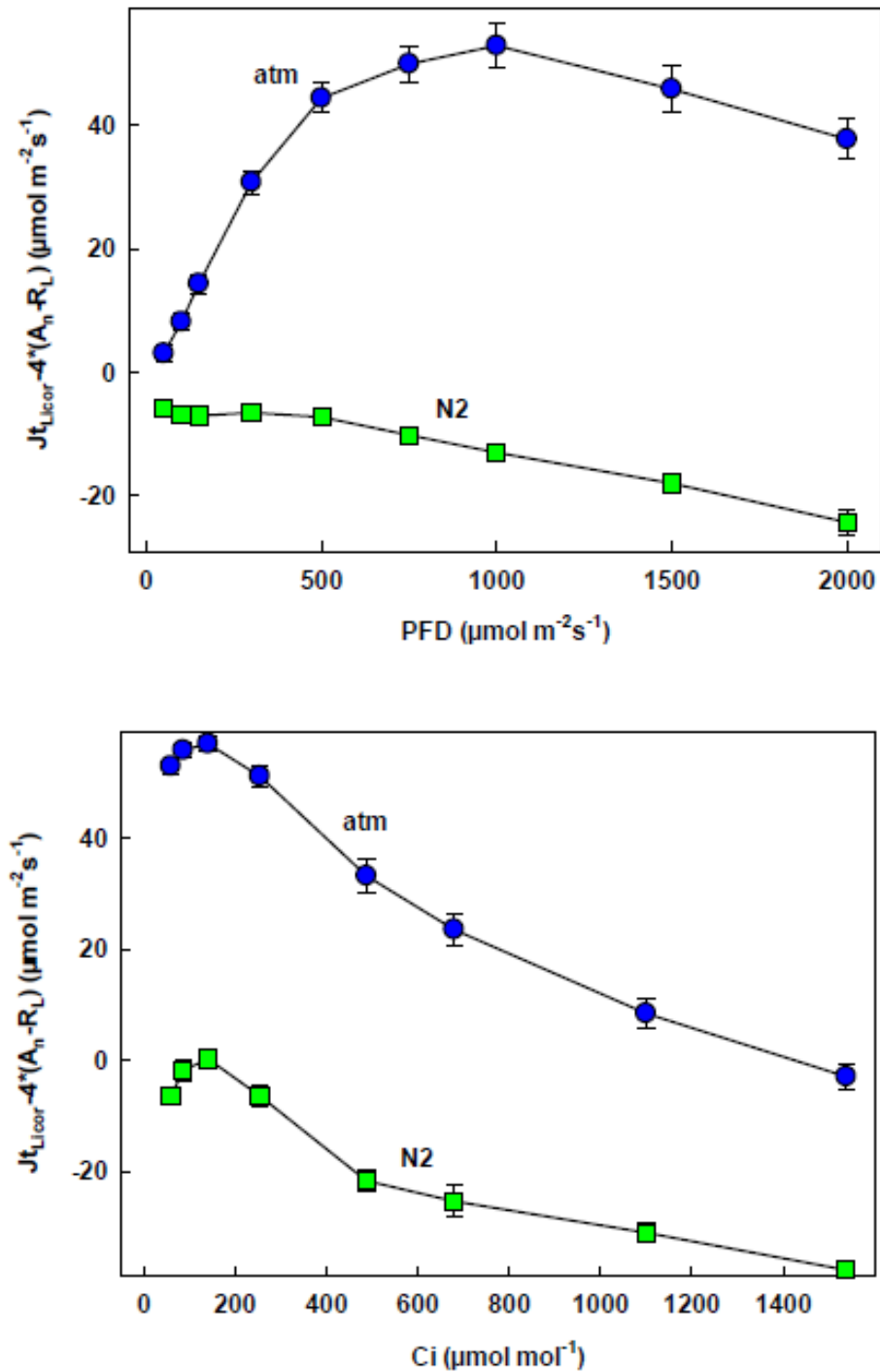


Figure 47: variation du transport excédentaire calculé selon (Krall and Edwards, 1992) $J_{t_{\text{Licor}}} - 4x(A_n - R_L)$ en fonction de l'intensité lumineuse (PFD) et de la pression partielle en CO_2 (C_i) chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* en condition atmosphérique ($n=12$) et N_2 ($n=4$)

Il semble donc que le calcul de $J_{t_{\text{Licor}}}$ selon (Krall and Edwards, 1992), donne un résultat incorrect pour des feuilles épaisses telles que *S.alpina*. Comme dit plus tôt, on peut émettre l'hypothèse que le soucis vient de l'utilisation pour le calcul du $J_{t_{\text{Licor}}}$ selon (Krall and Edwards, 1992) des paramètres de fluorescence chlorophyllienne. En effet, les paramètres de fluorescence chlorophyllienne mesurés correspondent principalement à la fluorescence émise par la première couche de parenchyme palissadique de la feuille (Govindjee and

Papageorgiou, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2017). Compte tenu de l'épaisseur de la feuille et des nombreuses couches composant l'épiderme et le parenchyme palissadique des feuilles de *Soldanella alpina* en particulier (Talhouët *et al.*, 2019) et des plantes alpine de façon générale (Körner *et al.*, 1989), le J_{Licor} ainsi calculé selon (Krall and Edwards, 1992) ne correspond pas à l'assimilation mesurée dans les feuilles entières.

A défaut d'utiliser le ϕPSII pour le calcul de l'ETR comme le fait le Licor, on pourrait être tenté d'utiliser le ϕCO_2 pour recalculer l'ETR selon (Cornic and Ghashghaie, 1991). Ce recalcul est basé sur l'hypothèse suivante : dans l'azote, l'oxygène étant absent, l'unique accepteur possible pour les électrons est le CO_2 . Les transports alternatifs tels que la nitrate réductase, thioredoxine,...sont considérés comme mineurs et sont pris en compte par la méthode. Il est alors possible d'établir une relation entre ϕCO_2 (mesuré avec le suivi de l'assimilation du CO_2 et corrigé en tenant compte de la respiration à la lumière et l'absorption des feuilles comme pour le Licor) et ϕPSII dans l'azote. En extrapolant cette relation $\phi\text{CO}_2 / \phi\text{PSII}$ dans une atmosphère normale il devient possible de recalculer un ϕCO_2 hypothétique correspondant au ϕPSII obtenu dans une atmosphère normale en utilisant la relation $\phi\text{CO}_2 / \phi\text{PSII}$ obtenue dans l'azote comme courbe de calibration. On peut ensuite recalculer le transport électronique nécessaire pour supporter ce ϕCO_2 hypothétique en supposant que 4 électrons sont nécessaires pour la fixation d'une molécule de CO_2 et en prenant en compte le nombre de photons absorbés. Cependant, le modèle de (Cornic and Ghashghaie, 1991) se base sur l'hypothèse que le ϕPSII dans l'atmosphère correspond à 4 électrons transportés. Cette hypothèse est correcte pour les électrons allant à la photosynthèse et à la photorespiration. En revanche pour les transferts d'électrons à l'oxygène par les flux alternatifs tels que le cycle de Mehler, PTOX ou la valve malate, seul 1 à 4 électrons sont nécessaires. (Kramer and Evans, 2011)

Afin de faciliter la présentation, il a donc été choisi de garder l'hypothèse des 4 électrons pour tous les calculs à l'exception de ceux concernant les électrons en excès. Pour les électrons en excès, allant potentiellement aux flux alternatifs, on prendra l'hypothèse la plus radicale du transport de 1 électron correspondant au ϕPSII .

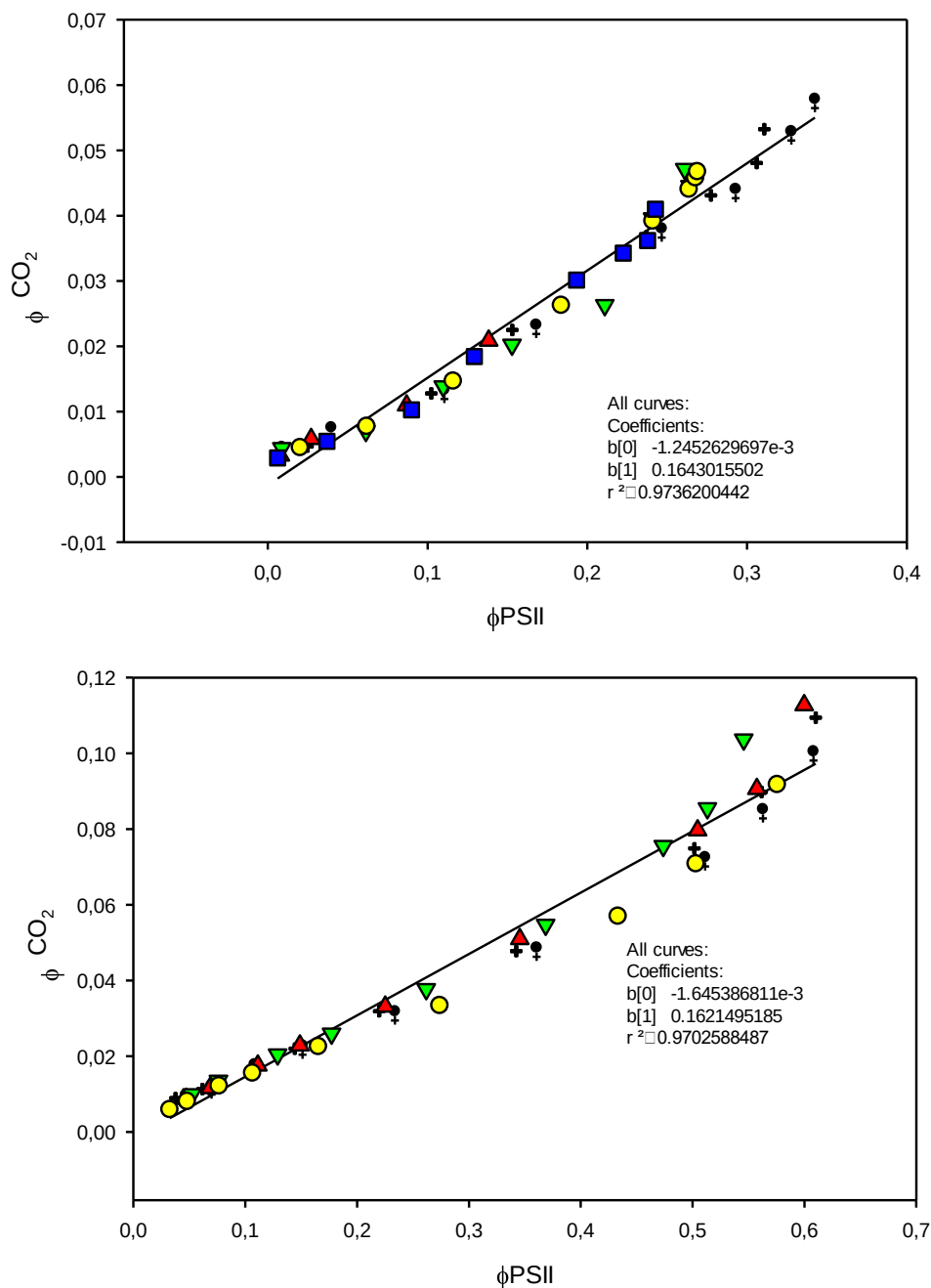


Figure 48: courbe de calibration représentant ϕ_{CO_2} versus ϕ_{PSII} pour les feuilles de *Soldanella alpina* mesurée dans une atmosphère dépourvue de dioxygène en fonction de l'intensité lumineuse (courbe du haut, n=6) et en fonction de la concentration interne en CO_2 (courbe du bas, n=5)

Dans la littérature (Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013) une corrélation linéaire est utilisée pour modéliser la relation entre ϕ_{CO_2} et ϕ_{PSII} en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO_2 . Comme on peut le voir sur la figure 48, cette corrélation linéaire n'est pas tout à fait exacte, notamment aux extrêmes. Des corrélations sigmoïdes et quadratiques ont donc été testées et donnent les résultats obtenus sur le tableau n°49.

Donnée	Regression	R	R ²	R ² corrigé	Erreur standard
PFD	Lineaire		0.974		
	Quadratique	0.991	0.983	0.982	0.004
	Sigmoïde	0.99	0.98	0.979	0.005
CO ₂	Lineaire		0.970		
	Quadratique	0.992	0.983	0.983	0.002
	Sigmoïde	0.994	0.988	0.987	0.002

Figure 49: tableau comparatif de la correspondance avec les données de différents modèles de régression pour les courbes ϕCO_2 ϕPSII

Si l'on compare les coefficients de détermination des différents modèles de régressions testés, on constate en effet que la corrélation linéaire est dans tout les cas la plus faible. C'est-à-dire que bien que correspondant relativement bien aux données, le modèle linéaire n'est pas optimal.

Toujours d'après les coefficients de détermination, il semble que, dans le cas des données récoltées à intensités lumineuses variables, la corrélation quadratique est le modèle le plus adapté, tandis qu'un modèle sigmoïde semble être ce qui correspond le mieux aux données obtenues à pressions partielles en CO₂ variables.

On utilise le ϕCO_2 pour recalculer le flux électronique total puis on soustrait les électrons allant à la photosynthèse et la respiration obtenus grâce aux mesures d'assimilation du CO₂ en fonction de l'intensité lumineuse et en fonction de la pression partielle en CO₂ dans une atmosphère dépourvue de dioxygène afin de vérifier les suppositions faites plus tôt de la même façon que sur les données du Licor.

On obtient ainsi les graphiques suivant :

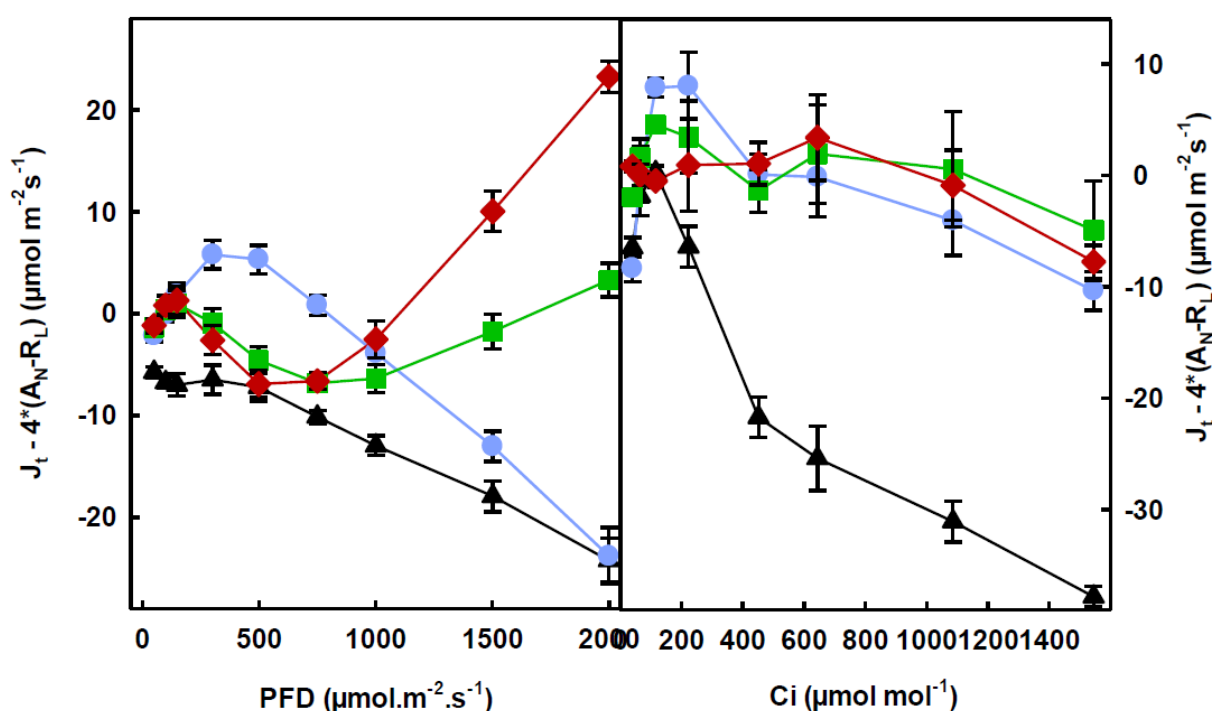


Figure 50: calcul du flux électronique en excès chez les feuilles de *Soldanella alpina* mesuré dans une atmosphère dépourvue de dioxygène à intensité lumineuse variable (à gauche) ou à concentration en CO_2 variable (à droite) . Le flux électronique en excès est calculé à partir du flux électronique total recalculé à partir des regressions lineaire (en bleu), quadratique (en vert), sigmoïde (en rouge) et à partir de l'ETR donné par le Licor (en noir)

Le flux électronique en excès ($J_T - 4x(A_n - R_L)$) en fonction de l'intensité lumineuse montre un nombre d'électrons en excès proche de 0 pour les régressions sigmoïde, linéaire et quadratique à faible lumière. Cependant à forte lumière on a des différences très importantes : le flux électronique en excès dans le cas de la régression linéaire diminue tout comme le flux électronique en excès calculé à partir du J_t donné par le Licor. Le flux électronique en excès recalculé à partir du J_t corrigé par la régression sigmoïde augmente à forte lumière jusqu'à $20 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. C'est le flux électronique en excès recalculé à partir du J_t corrigé par la régression quadratique qui se rapproche le plus de 0. Ce qui confirme que la régression quadratique est la plus adaptée pour les courbes d'assimilation en fonction de l'intensité lumineuse.

L'ETR en excès en fonction de la concentration interne en CO_2 montre un nombre d'électrons en excès proche de 0 pour les régressions linéaires, quadratiques et sigmoïdes. Cependant, avant $600 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ de CO_2 , la corrélation sigmoïde semble être la plus adaptée. Après $600 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, la corrélation quadratique est la meilleure en moyenne bien que sans différences significatives avec la corrélation sigmoïde. Au final, il semble effectivement que la corrélation sigmoïde soit la plus adaptée pour les courbes d'assimilation en fonction de la concentration interne en CO_2 .

A présent qu'il a été établi que le J_t brut donné par le Licor tout comme le recalcul selon (Krall and Edwards, 1992) n'est pas idéal et que l'on a déterminé quelle est la meilleure

méthode pour le recalculer correctement, on peut tout de même se demander comment calculer précisément le flux électronique vers la photorespiration et la photosynthèse.

Il y a plusieurs manières de déterminer le transport électronique vers l'oxygénation de la Rubisco. On peut tout d'abord calculer la différence d'assimilation du CO_2 entre la mesure faite dans l'azote (sans oxygène donc sans photorespiration) et la mesure faite dans une atmosphère normale. Sous le postulat qu'il est nécessaire d'avoir 4 électrons pour fixer une molécule de dioxygène par la Rubisco, alors en multipliant la différence par 4 on aurait ainsi le flux d'électron vers la photorespiration.

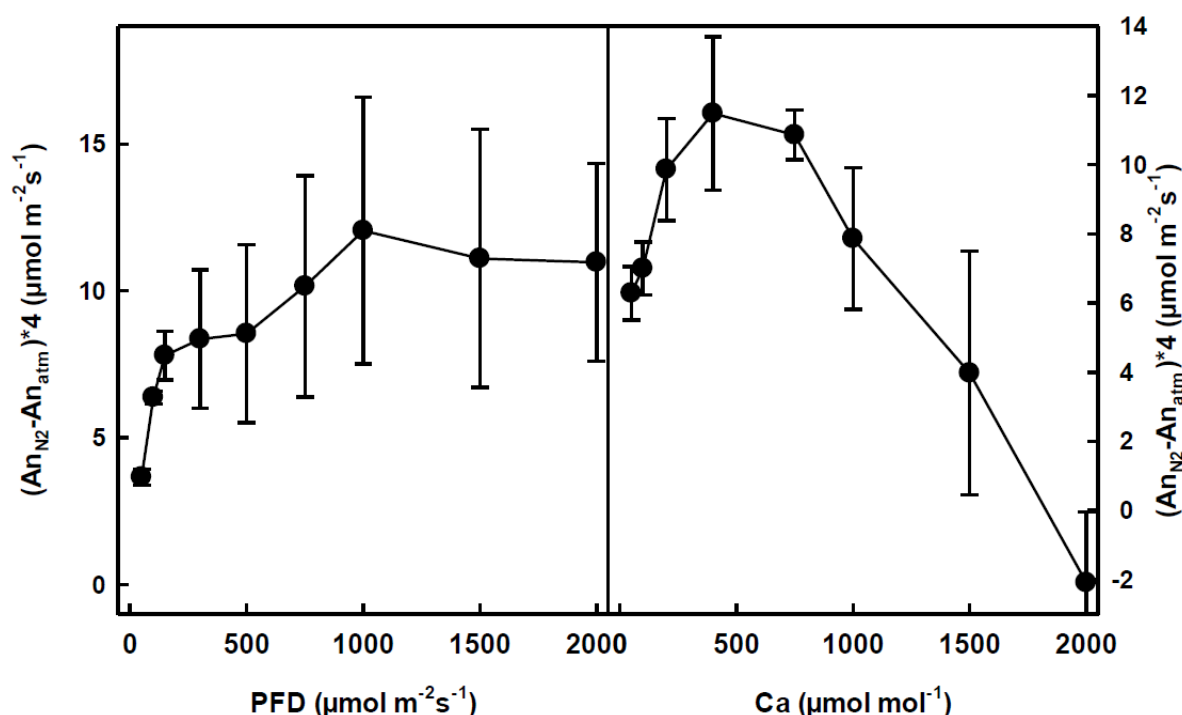


Figure 51: nombre d'électrons attribué à la photorespiration calculé à l'aide de la différence d'assimilation du CO_2 dans une atmosphère sans oxygène et dans une atmosphère avec oxygène, multiplié par quatre (sous le postulat que 4 électrons sont nécessaires pour l'assimilation d'une molécule de dioxygène) chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*

Malgré un écart type grand, on constate en moyenne une augmentation du nombre d'électrons attribués à la photorespiration en fonction de l'intensité lumineuse jusqu'à $10 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en moyenne mais une diminution de celui-ci en fonction de la concentration interne en CO_2 . La diminution du flux attribués à la photorespiration en fonction de la concentration interne en CO_2 est en accord avec l'inhibition de la photorespiration à fortes concentrations internes en CO_2 . Le flux recalculé cette fois pour la photorespiration est très inférieur au J_o calculé selon (Epron *et al.*, 1995) en utilisant la fluorescence chlorophyllienne sans que l'on ait cette fois d'explication potentielle. Cela pourrait nous laisser penser que la méthode de (Epron *et al.*, 1995) surestime le flux électronique allant à l'oxygénation de la Rubisco.

On peut également comparer le flux électronique calculé sur cette méthode avec la différence de flux électronique entre l'atmosphère normale et l'atmosphère dépourvue de dioxygène. Nous avons répété ce calcul avec tous les recalculs du flux électronique total ($J_{T_{Licor}}$, $J_{T_{Lineaire}}$, $J_{T_{Quadrat}}$, $J_{T_{Sigmoïde}}$). Ce flux électronique résiduel correspond au flux attribué à l'oxygène ce qui inclut donc la photorespiration, la réaction de Mehler, la valve malate, l'activité PTOX,...

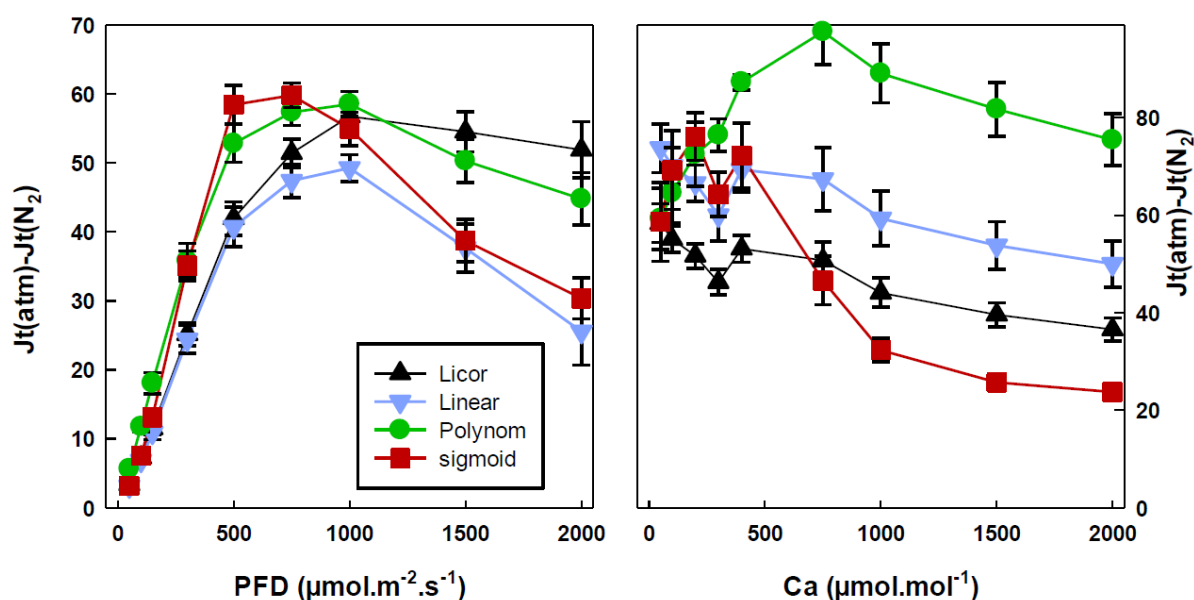


Figure 52: Flu111x électronique attribué à l'oxygène calculé grâce à la différence des flux électroniques totaux recalculé à partir des courbes de calibration $\phi CO_2/\phi PSII$ établie dans l'azote avec des regressions linéaire (en rouge), quadratique (en vert) ou sigmoïde (en bleue) chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*

On constate pour les J_t obtenus par le Licor et par le recalcul linéaire une augmentation du flux électronique vers l'oxygénation de la Rubisco en fonction de l'intensité lumineuse. Pour les recalculs quadratiques et sigmoïdes on constate une augmentation du flux électronique vers l'oxygène jusqu'à un maximum atteint à 500 μmol de photon. $m^{-2}.s^{-1}$, puis une diminution.

Si on estime qu'il y a une refixation des 3 à 4 molécules de CO_2 produites via la photorespiration (ce qui correspondrait alors à un flux électronique de 12 à 16 électrons - comme vérifié avec le calcul des figures n°47 et 52) alors à 500 μmol de photon. $m^{-2}.s^{-1}$, on a entre 25 et 35 μmol d'électrons. $m^{-2}.s^{-1}$ vers l'oxygène pour tous les modèles testés. Cela est bien supérieur aux 10 μmol d'électrons. $m^{-2}.s^{-1}$ électrons en moyenne que l'on trouve dans le calcul précédent (figure n°51) basé sur la différence d'assimilation. Il semble donc y avoir des électrons qui sont créés mais ne vont pas réellement à la photorespiration ou la photosynthèse et pourrait donc être compté comme étant en excès. Néanmoins, il convient de garder à l'esprit que la relation entre ϕCO_2 et $\phi PSII$ dans l'atmosphère ne correspond pas exactement à 4 électrons mais qu'elle correspondrait d'avantage à une quantité inférieure d'électrons probablement de l'ordre de 1 électrons pour le transport excédentaire (Kramer and Evans, 2011).

Enfin, on compare notre modèle basé sur la fluorescence chlorophyllienne à un calcul indépendant de la photorespiration et qui ne dépend pas non plus de la fluorescence. Le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) est pour cela une bonne référence. En effet, il définit la photosynthèse (A_n) comme fonction de la vitesse de carboxylation de la Rubisco (noté V_c), de sa vitesse d'oxygénation (photorespiration), noté V_o et de la respiration à la lumière (noté R_L). On a ainsi :

$$A_n = V_c - 0,5 \times V_o - R_L$$

La respiration à la lumière est estimée, tel que décrit dans le Matériel et Méthodes, par la méthode de Laisk (Laisk, 1977) en mesurant l'assimilation du CO_2 à des pression partielles de CO_2 faibles et des intensités lumineuses différentes.

Pour les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*, on obtient les courbes suivantes :

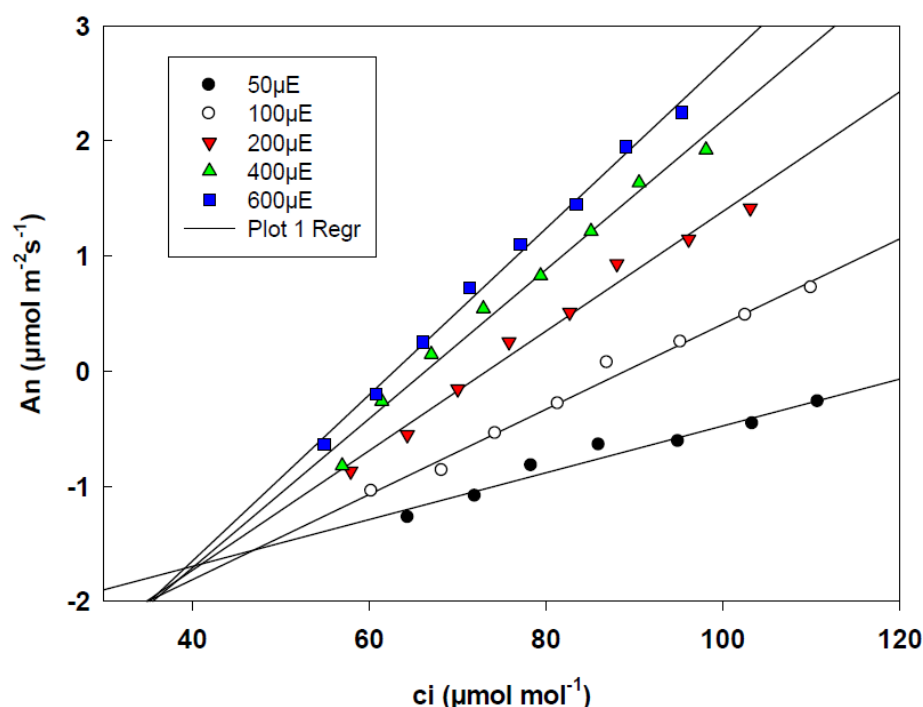


Figure 53: courbes d'assimilation du CO_2 en fonction de la pression partielle en CO_2 à 5 intensités lumineuses différentes chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*

Sur la figure 53, on voit que l'assimilation en fonction de la pression partielle en CO_2 pour chaque intensité lumineuse peut être modélisée par une régression linéaire. Les différentes droites de régressions obtenues se rejoignent en un point, appelé point de compensation correspondant ici à une assimilation de $-2 \mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une pression partielle d'environ $38 \mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$ (gamma star). C'est au niveau du point de compensation que la photosynthèse et la respiration se compensent et c'est donc en ce point que l'on a la respiration à la lumière.

La détermination du point de compensation ne pouvant se faire avec précision sur un graphique comme celui présenté en figure 53 on préfère représenter la pente des différentes droites de régression en fonction de l'ordonnée à l'origine, cette dernière étant la respiration à la lumière.(Walker and Ort, 2015)

Sur cette nouvelle représentation graphique, on est capable de modéliser les points de nouveau par une régression linéaire. La pente de la droite de régression correspondant cette fois au gamma star et l'ordonnée à l'origine à la respiration à la lumière (figure 40).

Ici, on peut donc déterminer plus précisément que la respiration à l'obscurité est de $1,79 \mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et que le gamma star est de $38,7 \mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$.

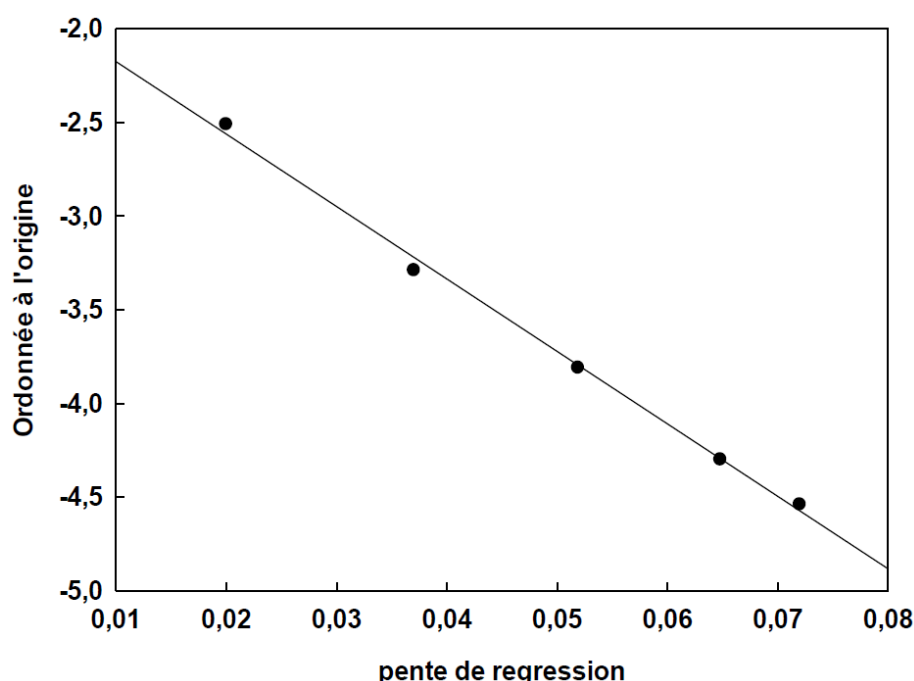


Figure 54: représentation de l'ordonnée à l'origine en fonction de la pente de la droite de régression obtenue selon la méthode de (Laisk, 1977) chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*

L'expérience a été refaite avec 13 réplicas indépendants qui nous donnent un gamma star moyen de $36 \pm 1,6 \mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$ et une respiration à la lumière de l'ordre de $-1,6 \pm 0,3 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. On peut comparer ses valeurs aux valeurs de la respiration dans le noir et se rendre compte que la respiration à la lumière représente en moyenne, chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*, 77% de la respiration à l'obscurité.

Le gamma star permet de calculer le facteur de spécificité apparent de la Rubisco de la façon suivante(Laing *et al.*, 1974) :

$$S_{app} = \frac{0.5 \times \text{pression partielle en oxygène} \times \text{solubilité du dioxygène}}{\text{gamma star} \times \text{solubilité du dioxyde de carbone}}$$

Par calcul, on arrive à un facteur de spécificité apparent moyen de 108 pour les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*. Il faut néanmoins noter que ce facteur de spécificité apparent de

la Rubisco est calculé à l'aide d'un gamma star déterminé avec la pression partielle en CO₂ interne et non à l'aide de la pression partielle en CO₂ à l'intérieur du chloroplaste. Cette façon de procéder entraîne une sous-estimation de l'ordre de 5 μmol.mol⁻¹ du gamma star (Gong *et al.*, 2018). Cependant le facteur de spécificité apparent mesuré reste dans une gamme de valeur raisonnable et ne paraît donc pas aberrant par comparaison avec ce qu'il est possible de mesurer chez d'autres espèces (Galmes *et al.*, 2005). Néanmoins cela suppose que la conductance interne (g_m) ne varie pas dans les conditions de la mesure hors on sait d'après la littérature que le g_m fluctue en fonction de la pression partielle en CO₂ ou en fonction de la luminosité appliquée à la plante. Ici, pour justifier notre hypothèse d'un g_m constant on peut mettre en avant le fait que la mesure du facteur de spécificité s'est faite à plusieurs intensités lumineuses différentes et à des pressions partielles en CO₂ (C_i) variables ainsi que le fait qu'à chaque changement de luminosité, le C_i restait relativement stable. Dans ces conditions expérimentales particulières on estimera donc raisonnable de supposer la variation du g_m négligeable au regard de la variation des autres paramètres permettant la détermination du gamma star et le calcul du facteur de spécificité apparent de la Rubisco.

Selon (Epron *et al.*, 1995), le ratio vitesse de carboxylation/vitesse d'oxygénation de la Rubisco se calcule ensuite de la manière suivante :

$$\frac{V_c}{V_o} = S_{app} \times \frac{c_i}{O}$$

Dans le cas de figure des feuilles nouvellement formées de *Soldanella alpina*, on cherche V_c et V_o mais on connaît S_{app}, C_i et O. Ici la solubilité du CO₂ dans nos conditions expérimentales (25°C) est de 0,759 tandis que celle du O₂ est de 0,0282. On estime également dans le reste du calcul que la pression partielle du dioxygène dans l'atmosphère est de 21%.

$$\frac{V_c}{V_o} = 108 \times \frac{0,759 \times c_i}{210000 \times 0,0282}$$

$$\text{D'où} \quad V_c = \frac{(A_n - R_L)}{1 - \frac{0,5}{\frac{V_c}{V_o}}}$$

$$\text{Ainsi} \quad ETR_c = 4 \times V_c \quad \text{et} \quad ETR_o = 4 \times \frac{V_c}{V_o}$$

Après les calculs, il est possible de comparer les ETR_c et ETR_o ainsi obtenus avec les flux électroniques J_c et J_o calculés à l'aide des paramètres de fluorescence selon (Epron *et al.*, 1995).

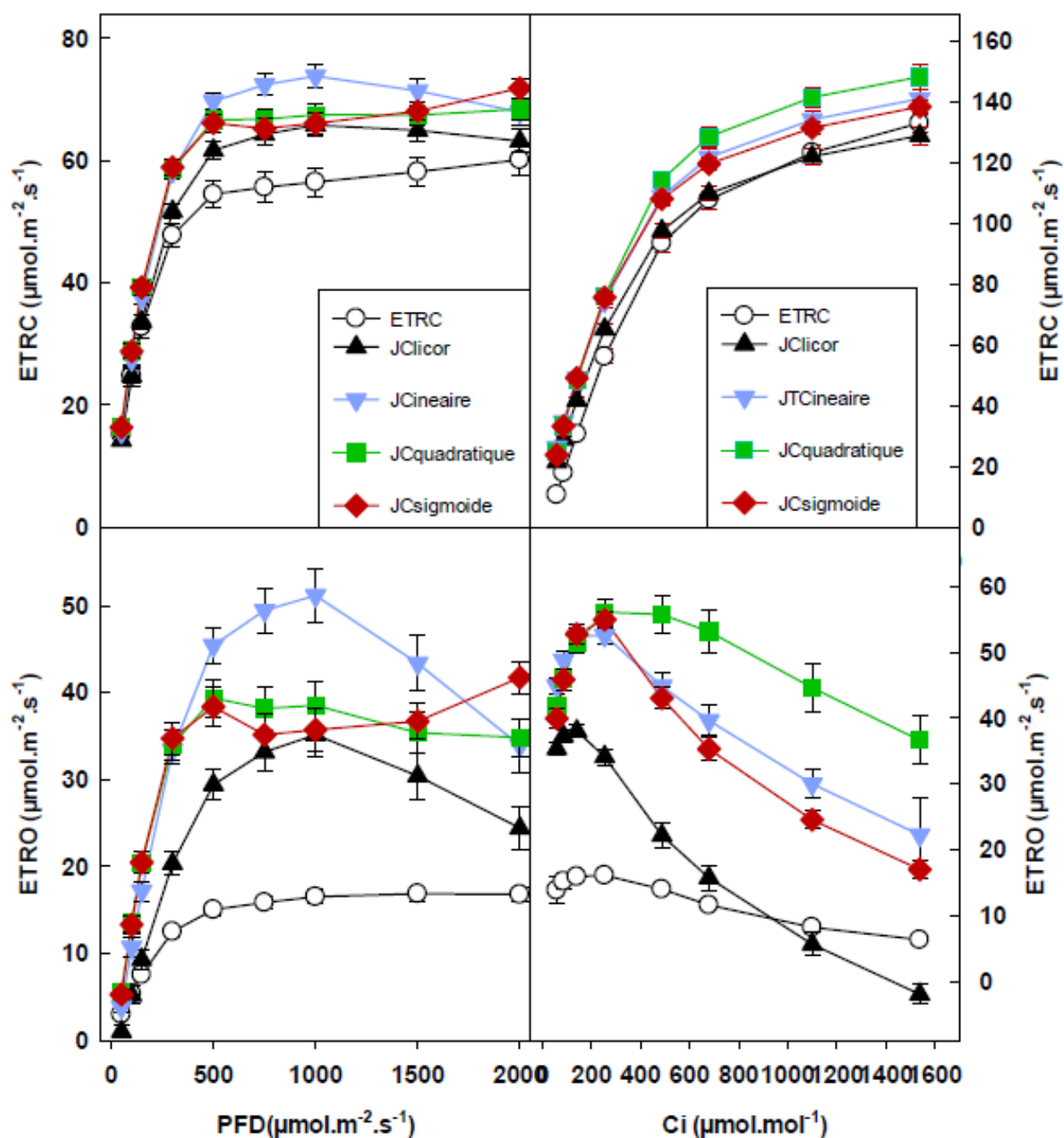


Figure 55: ETRo, ETRc calculé d'après le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) ainsi que Jc et Jo calculé d'après (Krall and Edwards, 1992) à partir des recalculs des paramètres de fluorescence à l'aide des régressions linéaire, quadratique et sigmoïde en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO₂ chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina*

On constate que peu importe la façon dont le J_c ou J_o est recalculé, les flux dont le calcul est basé sur les paramètres de fluorescence chlorophyllienne montrent beaucoup plus d'électrons transférés à la photosynthèse et à la photorespiration en comparaison avec le calcul basé sur le modèle de Farquhar. De plus, le calcul de l'ETR_o tel qu'obtenu selon le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) correspond d'avantage que le J_o calculé selon (Epron *et al.*,

1995) aux $15 \mu\text{mol d'électron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ correspondant à la photorespiration tels que calculé figure 51.

Dans tout les cas de figure, les flux électroniques vers la carboxylation de la Rubisco augmentent en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO_2 quel que soit le recalcul. L' ETR_c atteint un plateau vers $500 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les flux électroniques vers l'oxygénation augmentent en fonction de l'intensité lumineuse jusqu'à atteindre un plateau vers $750 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. En revanche, ils décroissent en fonction de l'augmentation de la pression partielle en CO_2 , ce qui jusqu'à présent est cohérent avec l'observation d'une inhibition de la photorespiration à fortes pressions partielles en CO_2 .

L' ETR_o recalculé selon le modèle de Farquhar en fonction de l'intensité lumineuse atteint un plateau correspondant à environ $15 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ce qui, en ordre de grandeur et si on considère l'écart type important, correspond au nombre d'électrons déterminés sur la figure 42 à partir de la différence entre l'assimilation du CO_2 dans une atmosphère normale et dans une atmosphère dépourvue de O_2 . ETR_o recalculé selon le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) en fonction de la pression partielle en CO_2 diminue jusqu'à atteindre environ $8 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. C'est plus que l'absence d'électrons que l'on avait observés sur la figure 42 à partir de la différence entre assimilation dans une atmosphère normale et dans une atmosphère dépourvu de CO_2 . Cependant en terme d'ordre de grandeur, les données obtenues par la différence des assimilations du CO_2 dans l'azote et dans une atmosphère normale sont globalement plus proche des résultats donnés par recalcul de (Farquhar *et al.*, 1980) que des recalculs basés sur les paramètres de fluorescence chlorophyllienne.

S'il n'existe pas de différences aussi marquées pour ce qui est de l' ETR_c , il n'en reste pas moins qu'il semble que les recalculs basés sur le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) soient les plus proches de la réalité et permettent de corriger les erreurs obtenues avec les recalculs basés sur les paramètres de fluorescence chlorophyllienne. Cette différence existe également si l'on prend seulement en compte le calcul selon (Krall and Edwards, 1992), c'est-à-dire sans recalculer le transport électronique.

En utilisant ETR_o et ETR_c calculés selon (Farquhar *et al.*, 1980) on peut calculer le transport électronique vers les autres accepteurs $J_t - (\text{ETR}_c + \text{ETR}_o)$. Ce flux électronique vers les autres accepteurs est montré en figure 57 en prenant en compte tout les recalculs possibles du J_T discutés précédemment. Pour le calcul du J_T selon (Krall and Edwards, 1992) on obtiens un flux électronique en excès de l'ordre de $20 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à partir d'une intensité lumineuse de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou pour des pressions partielles en CO_2 faibles. A fortes pressions partielles en CO_2 le transport total donné par le Licor n'est pas suffisant pour prendre en charge les flux ETR_c et ETR_o . On a ainsi un transport électronique négatif. Néanmoins si le transport électronique est recalculé avec une relation linéaire,

quadratique ou sigmoïdes, le nombre d'électrons allant vers les autres accepteurs est plus important et significativement supérieur à 0.

Il faut garder à l'esprit que ces recalculs sont basés sur l'hypothèse d'une corrélation entre ϕCO_2 et ϕPSII correspondant à 4 électrons ce qui, comme on l'expliquait plus haut, peut ne pas être exact. En dehors de la photosynthèse et de la photorespiration pour lesquelles cette hypothèse est justifiée, pour certains flux alternatifs, le ϕPSII peut correspondre à moins de 4 électrons : 1 électron étant le minimum possible. (Kramer and Evans, 2011) En divisant le nombre d'électrons en excès par 4 on obtient alors le nombre d'électrons minimum attribués à des voies alternatives. Chez les feuilles de *Soldanella alpina* jeune, on arrive ainsi avec le recalcul sigmoïde des courbes en fonction de l'intensité lumineuse à un minimum de $9 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en excès à $500 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et à un minimum de $15 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en excès à $250 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ avec le recalcul quadratique sur les courbes en fonction de la pression partielle en CO_2 .

En conclusion, chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* la répartition des électrons à lumière saturante est la suivante : $60 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la photosynthèse, $15 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la photorespiration et au minimum $9 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les flux alternatifs. Sur les courbes en fonction de la pression partielle en CO_2 le transport alternatif est légèrement plus fort avec au maximum $12 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ supplémentaires.

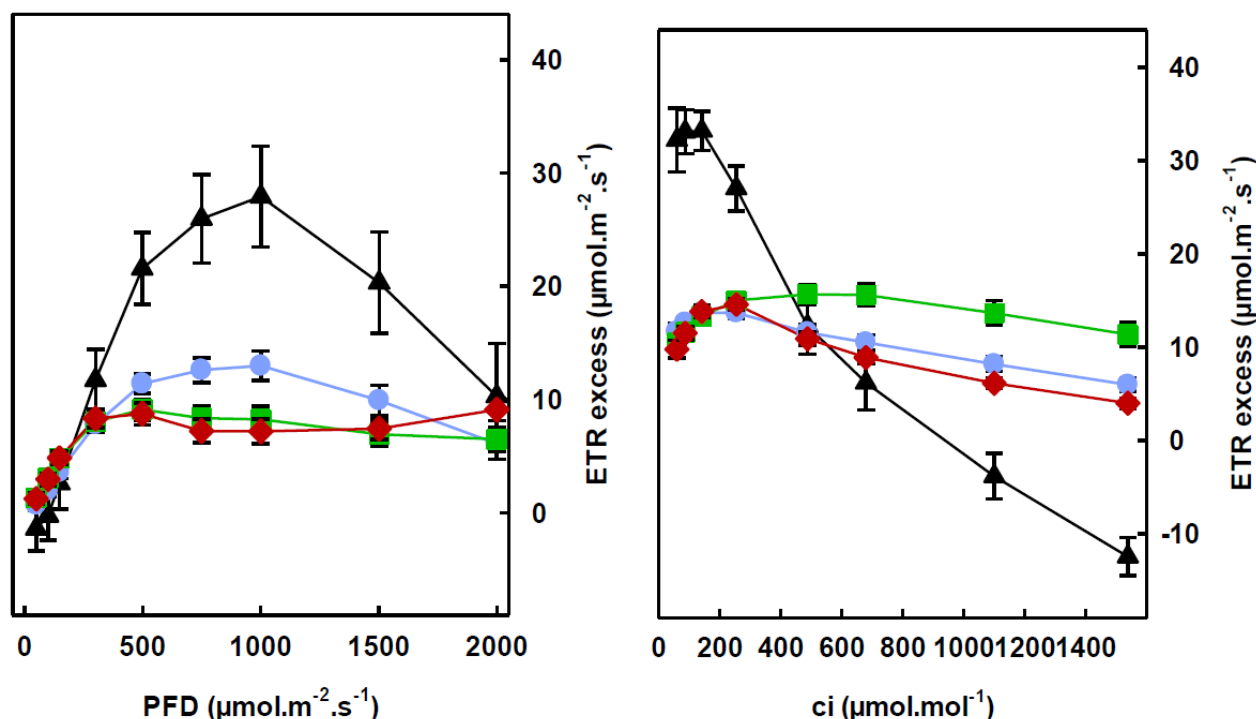


Figure 56: flux électronique vers les accepteurs autres que la photorespiration ou la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO_2 chez les feuilles nouvellement formée de *Soldanella alpina*. Les flux électronique en excès sont calculé à partir des ETR données par le Licor (en noir) et recalculé selon (Krall and Edwards, 1992) une fois pris en compte les corrections du ϕCO_2 à l'aide des régressions linéaire

(en bleu), quadratique (en vert) et sigmoïde (en rouge). Pour les courbes recalculé selon (Krall and Edwards, 1992) le flux électronique restant a été divisé par 4.

Cette observation d'un flux électronique en excès non nul montre que dans le cas des plantes alpines les calculs utilisés d'ordinaire, se basant sur la fluorescence et l'hypothèse que les flux alternatifs sont faibles, ne conviennent pas. On retrouve en effet, quels que soit les recalculs effectués un nombre important (une dizaine à minima) d'électrons n'étant pris en charge ni par la photorespiration ni par la photosynthèse et qui doivent donc être dissipés autrement.

Afin de confirmer la validité de notre modèle de calcul du transport en excès malgré les différentes hypothèses et approximations que l'on a fait notamment sur la constance du g_m et le recalcul de la respiration à la lumière et du gamma star selon (Laisk, 1977), nous avons répété le calcul en prenant en compte les différentes erreurs que nous aurions pu faire au cours du recalcul :

- 1- Que la respiration à la lumière soit nulle ou encore qu'elle soit égale à la respiration à l'obscurité.

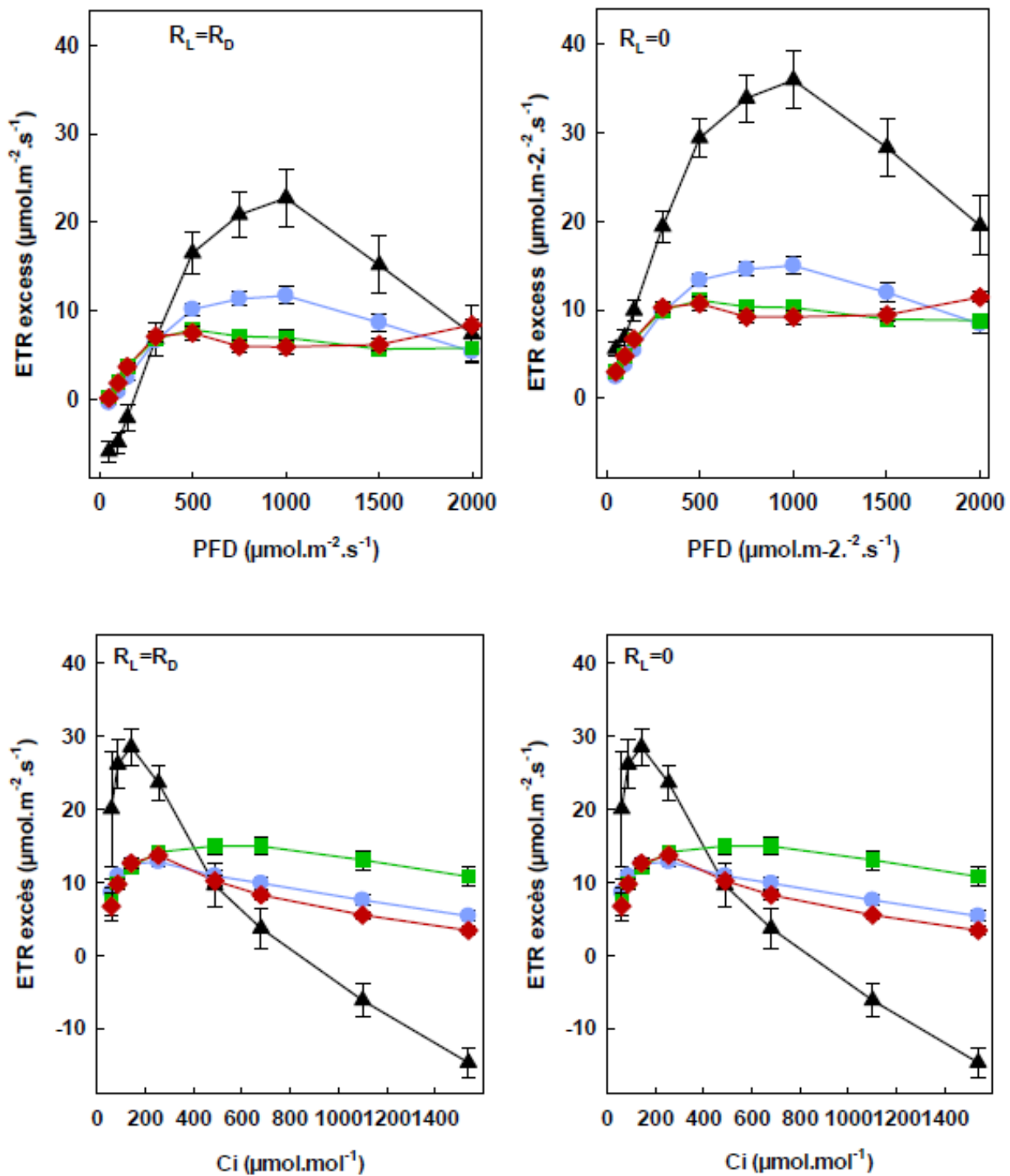


Figure 57: flux électronique vers des accepteurs autres que la Rubisco en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO_2 . On a pris pour hypothèse $R_L = R_D$ et $R_L = 0$. Les J_T utilisés pour le recalcul sont les $J_{T\text{Licor}}$ (en noir), $J_{T\text{Lineaire}}$ (en bleu), $J_{T\text{Quadratique}}$ (en vert) et $J_{T\text{Sigmoïde}}$ (en rouge). Pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse, il n'y a pas de différences significatives entre les résultats calculés selon la méthode, avec l'hypothèse $R_L = 0$ ou $R_L = R_D$, $p > 0.05$. Pour les courbes en fonction de la concentration interne en CO_2 , il n'y a pas de différences significatives entre les résultats calculés selon la méthode, avec l'hypothèse $R_L = 0$ ou $R_L = R_D$, $p > 0.05$.

Quelque soit l'hypothèse, on constate qu'il n'y a pas de différences sur les courbes en fonction de la pression partielle en CO_2 . En revanche sur les courbes en fonction de l'intensité lumineuse, plus la respiration à la lumière est proche de la respiration à l'obscurité plus le flux

électronique allant à d'autres accepteurs de la Rubisco est faible. Cette observation est d'autant plus vraie sur le calcul utilisant le $J_{T_{Lico}}$. En revanche même avec les hypothèses extrêmes que l'on a choisis on reste avec un flux électronique excédentaire du même ordre de grandeur avec au plus $3 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de différence avec les recalculs quadratiques pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse et avec les recalculs sigmoïdes pour les courbes en fonction de la pression partielle en CO_2 .

- 2- Que le facteur de spécificité de la rubisco varie selon la déviation standard du gamma star (ici 15%)

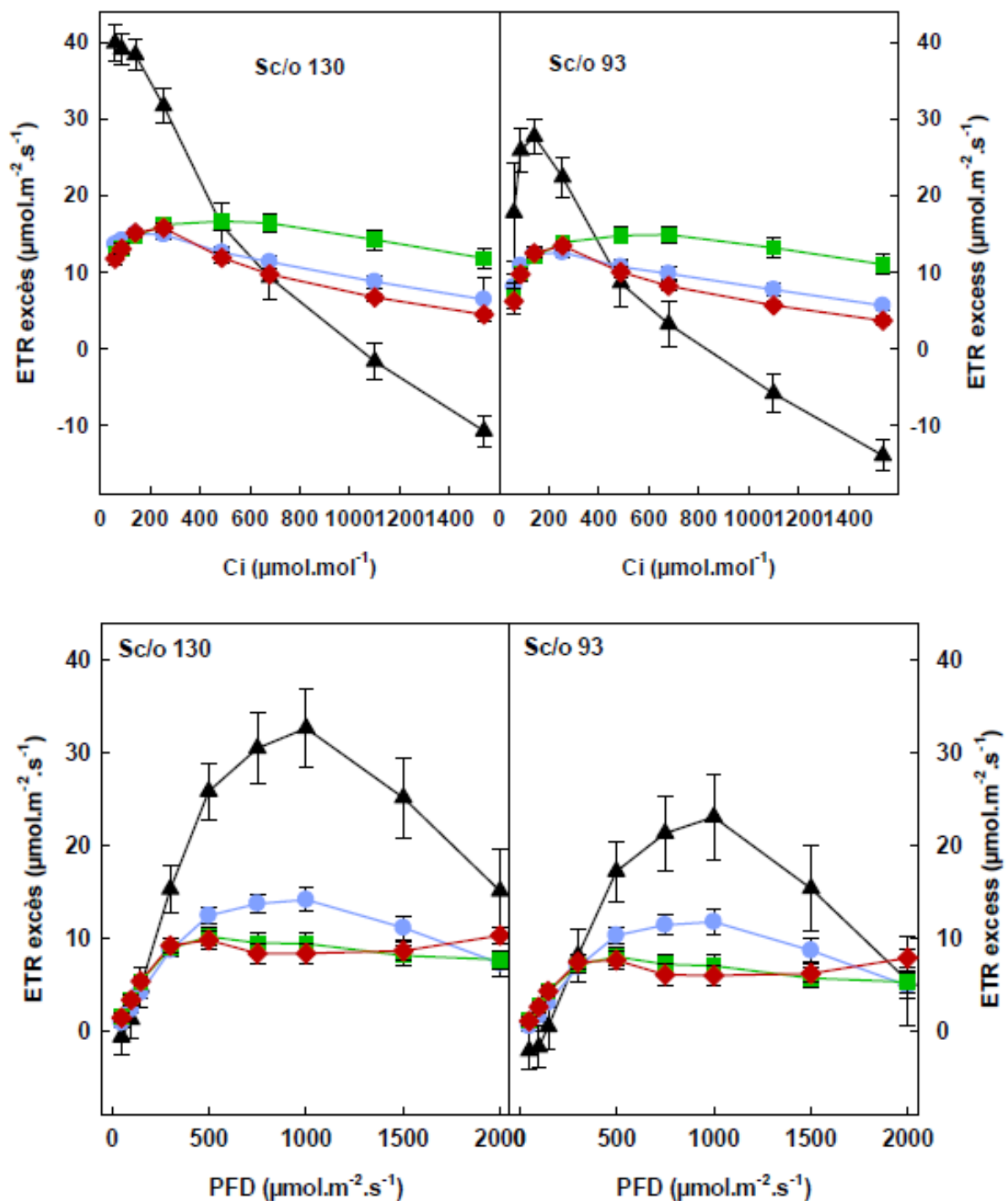


Figure 58 : flux électronique vers des accepteurs autres que la Rubisco en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO₂. On a pris pour hypothèse $S_{c/o}=130$ et $S_{c/o}=93$. Les J_T utilisés pour le recalcul sont les J_{TLicor} (en noir), $J_{TLineaire}$ (en bleue), $J_{Tquadratique}$ (en vert) et $J_{Tsigmoïde}$ (en rouge) Pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse comme pour les courbes en fonction de la concentration interne en CO₂, il n'y a pas de différences significatives entre les résultats calculés selon la méthode, avec l'hypothèse $S_{c/o}=130$ ou $S_{c/o}=93$, $p>0.05$.

On constate sur les courbes que plus on augmente le facteur de spécificité de la Rubisco et plus le flux d'électron excédentaire augmente notamment à faibles intensités lumineuses. Le flux électronique excédentaire calculé à partir de J_{TLicor} est encore une fois le plus sensible à la variation introduite au niveau du facteur de spécificité de la Rubisco.

Dans tous les cas, que ce soit pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse ou en fonction de la pression partielle en CO₂, il y a toujours un flux excédentaire non nul même en prenant des valeurs extrêmes pour le facteur de spécificité. Même en prenant des valeurs extrêmes on a une différence au maximum de $2\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

- 3- Que la pression partielle en C_i varie de plus ou moins 10%

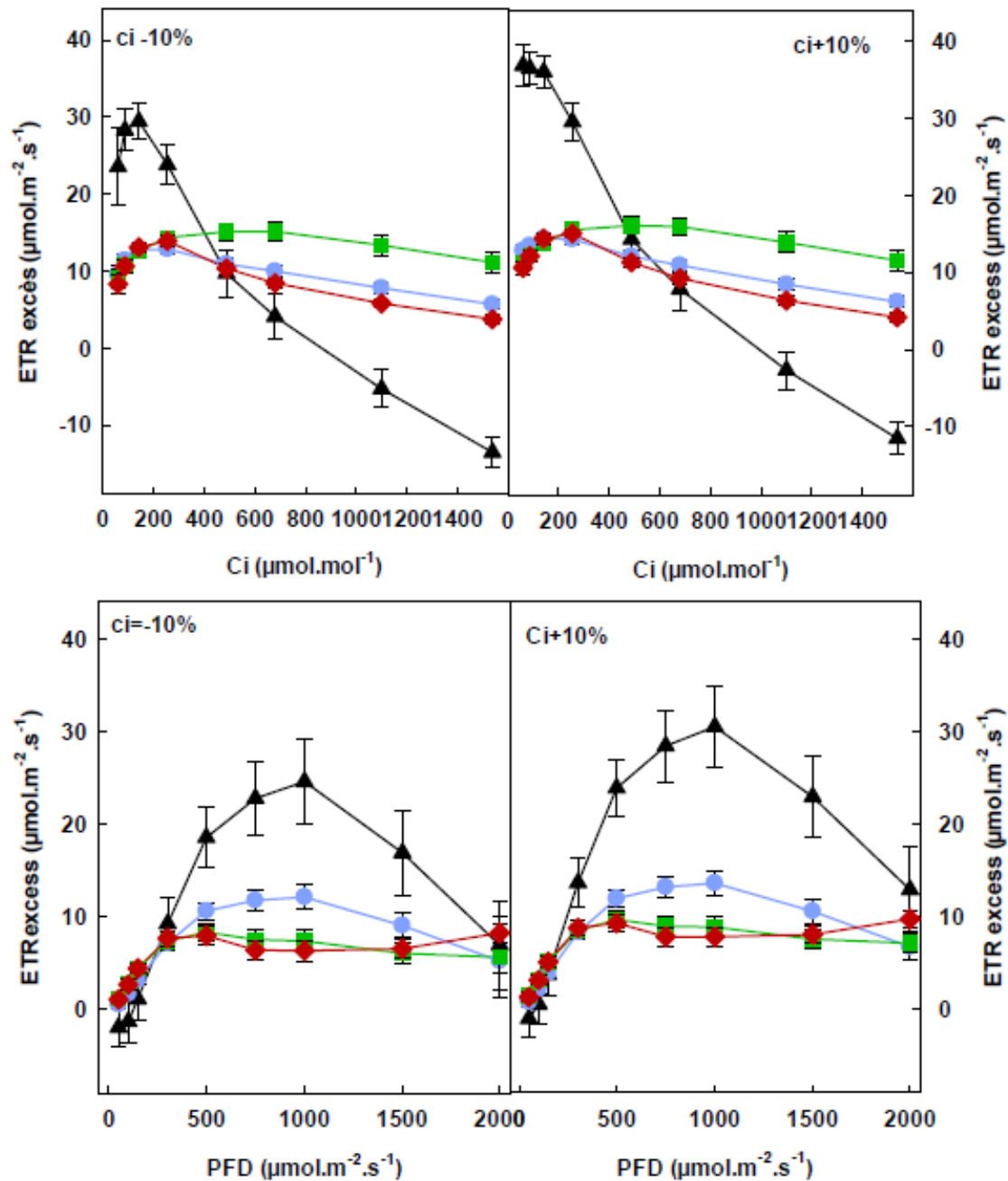


Figure 59: flux électronique vers des accepteurs autres que la Rubisco en fonction de l'intensité lumineuse et de la pression partielle en CO₂. On a pris pour hypothèse $C_i \pm 10\%$. Les JT utilisés pour le recalcul sont les J_{TLicor} (en noir), $J_{TLineaire}$ (en bleue), $J_{Tquadratique}$ (en vert) et $J_{Tsigmoïde}$ (en rouge). Pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse comme en fonction de la concentration en CO₂, il n'y a pas de différences significatives entre les résultats calculés selon la méthode, avec l'hypothèse $C_i + 10\%$ ou $C_i - 10\%$, $p > 0.05$.

On remarque que les recalculs basés $J_{TLineaire}$, $J_{Tquadratique}$ et $J_{Tsigmoïde}$ sont imperméable aux changements de C_i . En revanche, il y a une légère variation pour les recalculs utilisant J_{TLicor} : plus le C_i est faible et plus le flux électronique vers d'autres accepteurs que la rubisco est faible. On a une différence au plus de 1 μmol d'électrons.m⁻².s⁻¹)

Validation du modèle avec *A.thaliana* et *T.salsuginea*

Afin d'interpréter les résultats de nos calculs comme étant réellement un transport électronique en excès chez les plantes alpines dont la physiologie est mal connue, il a été choisi de travailler sur deux espèces contrôles : *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella salsuginea*. Les physiologies de ces plantes sont bien connues, de même que leurs réponses aux stress, notamment au stress salin. Afin de pouvoir discuter plus avant du lien entre stress oxydant et flux électronique excédentaire, il a été choisi de mesurer sur ces plantes l'assimilation du CO₂, et de recalculer les ETR totaux et excédentaires selon la méthode précédemment établie.

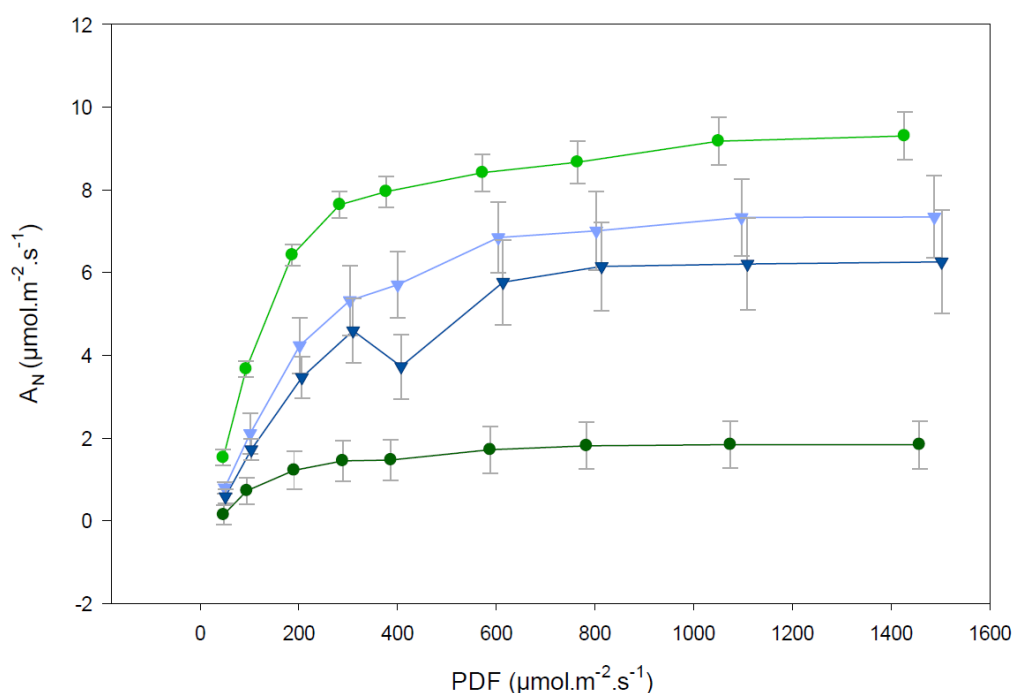


Figure 60: courbes d'assimilation du CO₂ mesuré au Licor en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *Thellungiella salsuginea*. Quatre conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressée à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé).

On constate là encore que les courbes d'assimilation à la lumière sont représentatives du fonctionnement normal de la photosynthèse chez les plantes. A savoir que la photosynthèse donc l'assimilation du CO₂ augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, jusqu'à arriver à un plateau de saturation de la photosynthèse à partir duquel, peu importe l'intensité lumineuse, la photosynthèse reste stable.

Toutes les conditions n'ont pas une photosynthèse équivalente. En effet, on constate que la photosynthèse est très forte chez *A.thaliana* contrôle. En revanche, après le traitement au NaCl les plantes d'*Arabidopsis thaliana* stressées voient leur photosynthèse drastiquement

diminuée : celle-ci est en effet presque nulle et ne représente que 10 à 20% de la photosynthèse potentielle chez une plante non traitée.

Les plants de *T.salsuginea*, s'ils ont une photosynthèse moins importante que *A.thaliana* contrôle, ils ont néanmoins une photosynthèse moins sensible au stress salin puisque comme on peut le voir figure 61, la photosynthèse des plants confrontés à un stress salin n'est pas plus faible que celle des plants contrôles.

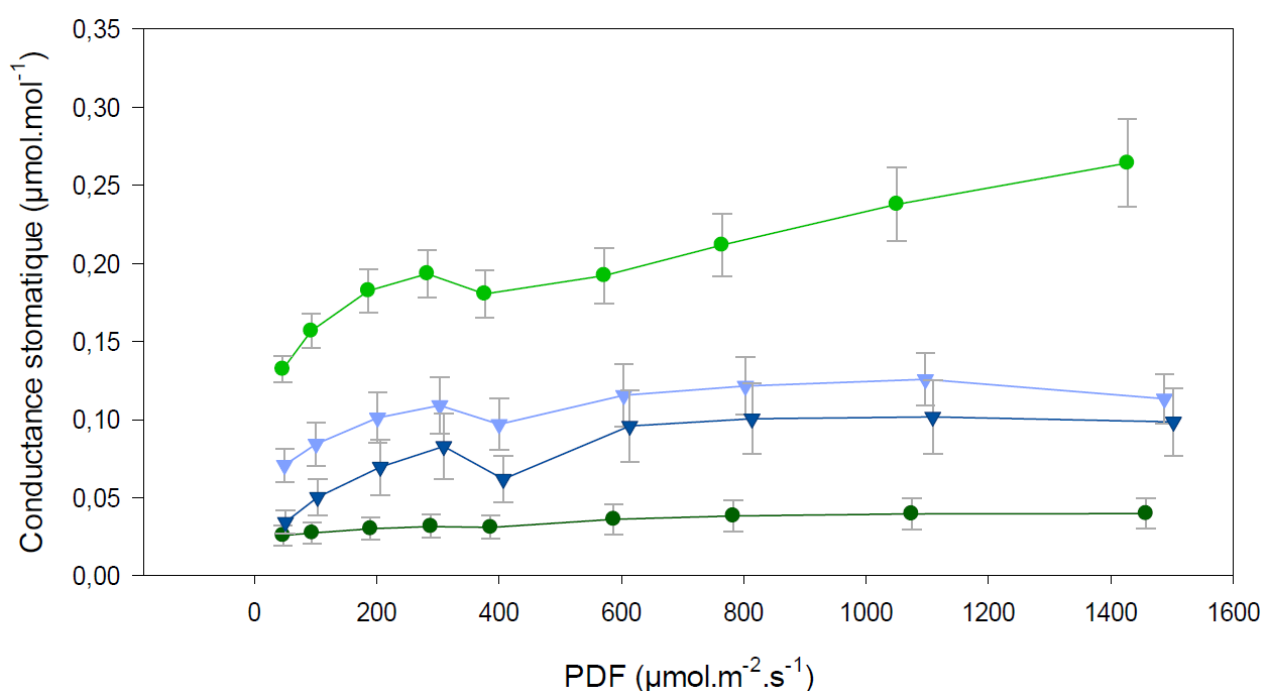


Figure 61: courbes de la conductance stomatique (conductivité) en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*. Quatres conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressée à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé)

La conductivité stomatique pourrait fournir quelques éléments de réponses pour expliquer la réponse de la photosynthèse aux différents traitements chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*.

On remarque en effet le même modèle que pour la photosynthèse. La conductance stomatique est très élevée chez *A.thaliana* contrôle tandis que chez *A.thaliana* stressée, la conductance est presque nulle. Tandis que la conductance stomatique est plus faible chez *T.salsuginea* stressée comme contrôle mais il n'existe pas de différences significatives entre les deux traitements chez *Thellungiella salsuginea*. Ainsi, le stress salin induit chez *Arabidopsis thaliana* une fermeture des stomates, tandis que chez *Thellungiella salsuginea* le stress salin n'a aucune influence sur ce paramètre.

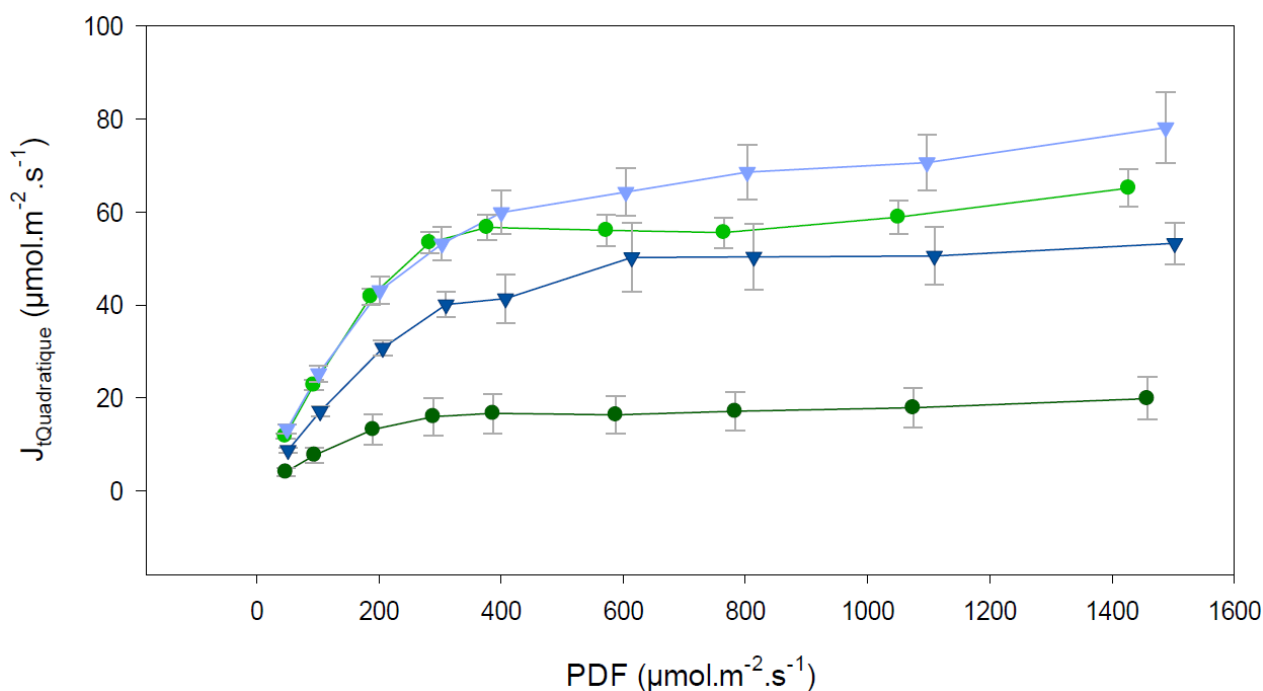


Figure 62: courbes du flux électronique total ($J_{Tquadratique}$) recalculé avec la calibration polynomiale quadratique en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*. Quatres conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressé à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé)

Le $J_{Tquadratique}$ est relativement représentatif de l'évolution de la photosynthèse (figure 62). En effet, le flux électronique total augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse et, atteint également un plateau. On retrouve un flux électronique total plus faible chez *A.thaliana* stressée par rapport à *A.thaliana* contrôle. En revanche, le calcul du flux électronique total montre cette fois une différence chez *Thellungiella salsuginea* en fonction du traitement. Chez les plantes contrôles, on observe en effet cette fois un flux électronique total significativement plus élevé par rapport à celui mesuré chez les plantes traitées avec 150mM de NaCl. De plus, contrairement à ce que l'on pouvait attendre au vu de la photosynthèse, on a cette fois un J_t plus important chez *T.salsuginea* par rapport à *A.thaliana* alors que c'était l'inverse pour l'assimilation (figure 62). On pourrait expliquer cette différence soit en faisant l'hypothèse d'un flux alternatif important chez *T.salsuginea* soit en faisant l'hypothèse d'une photorespiration plus importante et d'une refixation du CO_2 ainsi produit.

On a de la photorespiration calculé selon (Farquhar *et al.*, 1980) chez toutes les plantes étudiées et avec tous les traitements (figure n°63). Celle-ci augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à atteindre un plateau vers environ 600μmol de photons.m⁻².s⁻¹. Cependant il y a des différences notables entre les différents traitements. On remarque que pour *A.thaliana*, le flux électronique à l'oxygénation de la Rubisco est beaucoup plus important chez les plantes contrôle en comparaison avec les plantes traitées avec 150mM de NaCl. Chez *T.salsuginea*, l' ETR_o n'est pas très différent de ce que l'on observe chez *A.thaliana*

contrôle et on n'observe pas de différences marquées entre les deux traitements chez *T.salsuginea*. La photorespiration n'étant finalement pas plus importante (figure n° 59) chez *T.salsuginea* que chez *A.thaliana*, on peut penser que le J_t plus important chez *T.salsuginea* par rapport à *A.thaliana* comme vu plus haut (figure n°63) est d'avantage dû à la présence chez *T.salsuginea* d'un flux alternatif.

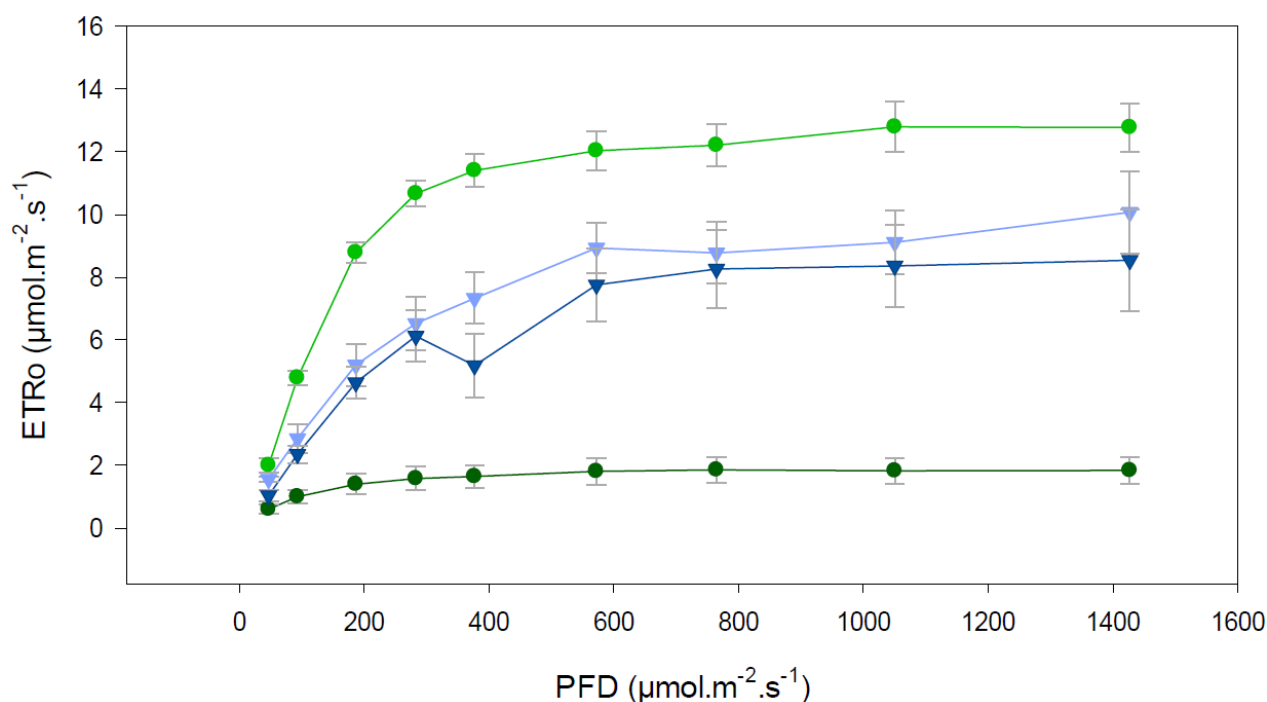


Figure 63: courbes du flux électronique allant à l'oxygénation de la Rubisco (ETRc) en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*. Quatre conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressé à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé)

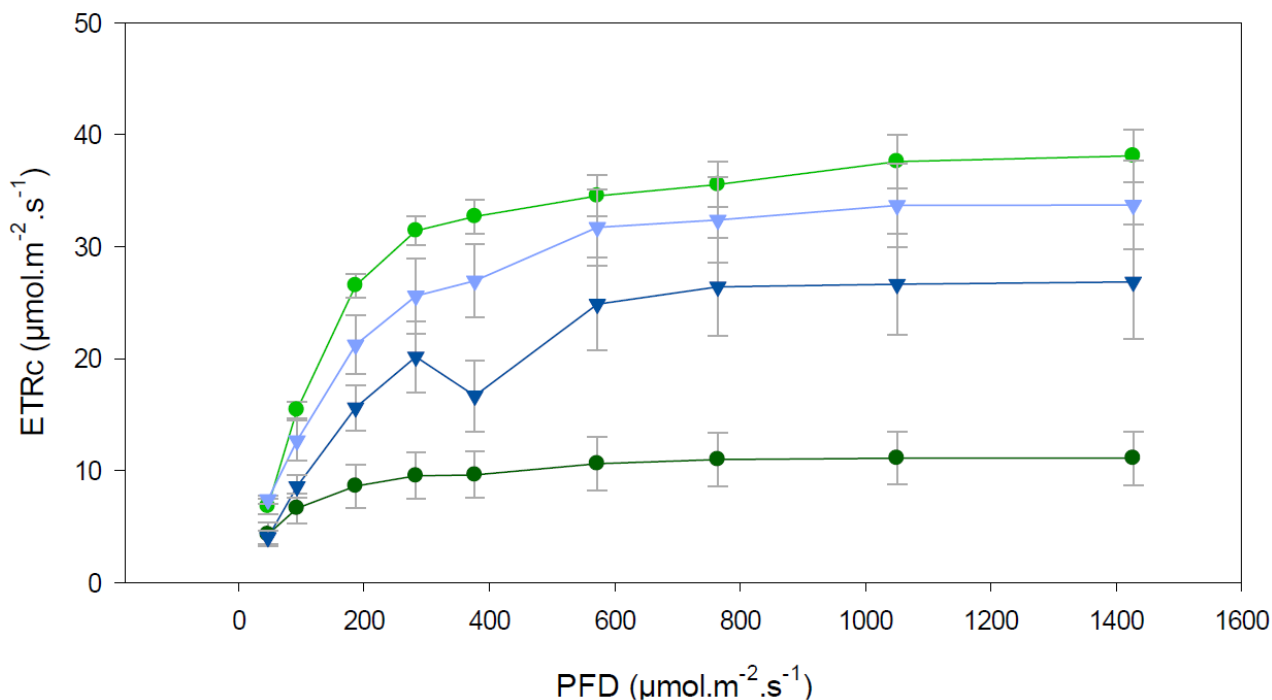


Figure 64: courbes du flux électronique allant à la carboxylation de la Rubisco (ETR_c) en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*. Quatres conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressé à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé)

L'ETR_c calculé selon (Farquhar *et al.*, 1980) montre un flux électronique (figure n°64) très fort vers la carboxylation de la Rubisco chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* contrôle alors que chez les plantes traitées avec 150mM de NaCl on a un flux électronique vers la carboxylation quasi nul. Cela va dans le sens de ce que l'on a pu voir pour l'assimilation du CO₂ qui montrait une photosynthèse très faible chez les plantes d'*A.thaliana* traité au NaCl en comparaison avec ce que l'on observait chez les plantes contrôles (figure 60).

On a un ETR_c important et similaire pour *T.salsuginea* ce qui est encore une fois est correct par rapport à ce que l'on voyait au niveau de la photosynthèse qui est similaire aussi entre les plants de *T.salsuginea* traité au NaCl et les contrôles. En revanche l'ETR_c comme la photosynthèse est plus faible chez *T.salsuginea* que chez les plantes d'*A.thaliana* contrôle.

Si on compare les ETR_o, ETR_c et le flux allant vers d'autres accepteurs que la Rubisco, on constate que le flux majeur est celui destiné à la photosynthèse.

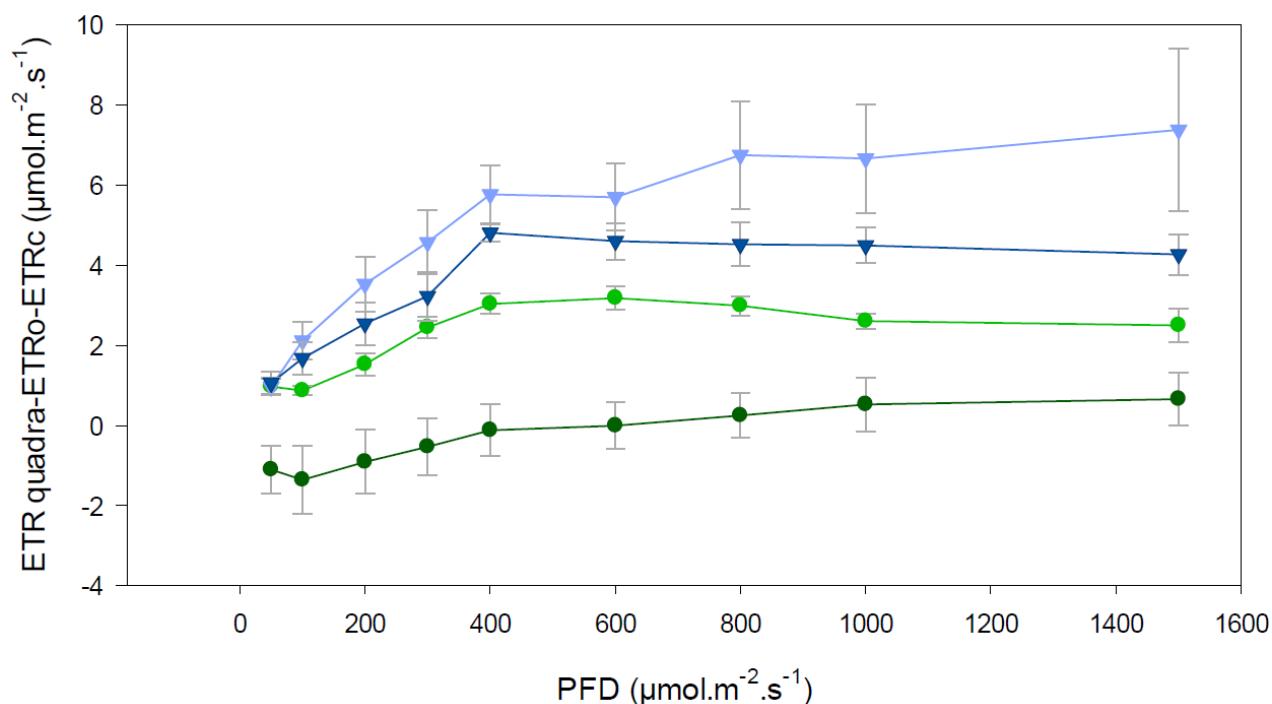


Figure 65: courbes du flux électronique excédentaire (ETR excès) en fonction de l'intensité lumineuse chez *A.thaliana* et *T.salsuginea*. Quatres conditions sont représentées, *A.thaliana* contrôle (vert clair), *A.thaliana* stressée à l'aide de 150mM NaCl (vert foncé), *Thellungiella salsuginea* contrôle (bleu clair) et *Thellungiella salsuginea* stressée à l'aide de 150mM NaCl (bleu foncé) Le flux excédentaire est divisé par 4 comme expliqué dans la partie méthode. Les données chez *A.thaliana* contrôle montrent une différence significative $p < 0,0001$ avec 0 tandis que les données chez *A.thaliana* stressé avec 150mM de NaCl montrent une différence significative avec 0, $p < 0,001$

Le flux en excès est calculé comme pour les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* à partir du $J_{T\text{quadratique}}$ et en utilisant les travaux de (Farquhar *et al.*, 1980) pour recalculer à l'aide du facteur de spécificité de la Rubisco les flux électroniques allant à la carboxylation et à l'oxygénation. Les données de respiration à la lumière, le gamma star, le facteur de spécificité et les équations de la corrélation entre ϕ_{PSII} et ϕ_{CO_2} utilisé dans les recalculs ont encore une fois été déterminé pour chaque condition et sont données dans le tableau suivant :

Espèces	Condition	Respiration à la lumière	Gamma star	Facteur de spécificité apparent de la Rubisco	Equation de la corrélation entre ϕ_{PSII} et ϕ_{CO_2}
A.thaliana	Contrôle (n=4)	$-0,97 \pm 0,12$	$25,89 \pm 4,7$	71,44	$\phi_{CO_2} = 0,0005 + 0,12 \times \phi_{PSII} - 0,01265 \times \phi_{PSII}^2$

	150mM NaCl (n=4)	-0,45±0,09	45,9±3,2	153,35	$\phi_{\square\square_2}$ = -0,00005 + 0,0683 × $\phi_{\square\square\square\square}$ - 0,1733 × $\phi_{\square\square\square\square}^2$
T.salsuginea	Contrôle (n=4)	-1,23±0,14	39,97±1,15	99,3	$\phi_{\square\square_2}$ = 0,0039 + 0,076 × $\phi_{\square\square\square\square}$ + 0,066 × $\phi_{\square\square\square\square}^2$
	150mM NaCl (n=4)	-1,13±0,7	33,77±11,6	87,55	$\phi_{\square\square_2}$ = 1,22 × 10 ⁻⁴ + 0,08 × $\phi_{\square\square\square\square}$ - 0,0055 × $\phi_{\square\square\square\square}^2$

Le flux électronique excédentaire calculé est plus faible chez *A.thaliana* et *T.salsuginea* comparé à ce que l'on calcule chez la plante alpine *S.alpina* (figure 65).

Ce flux excédentaire a tendance à augmenter avec l'intensité lumineuse jusqu'à atteindre un plateau à partir de 400 μmol de $\text{photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ puis à saturer.

Les réponses en terme de flux électroniques excédentaires varient en fonction des espèces et des conditions. Des deux plantes, *A.thaliana* a le flux excédentaire calculé le plus faible : les plantes contrôles ont un excès d'électrons au plus de l'ordre de 2 μmol d'électrons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tandis que les plantes stressées avec 150mM de NaCl ont elles un flux électronique excédentaire nul. Même s'il n'y a pas de différences significatives avec 0 dans les deux cas, en prenant en compte une erreur de notre méthode estimée à environ 2 μmol d'électrons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, on peut néanmoins considérer le flux électronique excédentaire chez *A.thaliana* comme nul. *Thellungiella salsuginea* présente un flux excédentaire compris au plus entre 6 et 8 μmol d'électrons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ donc plus important qu'*Arabidopsis thaliana*. Bien qu'à faible intensité lumineuse il n'y ait pas de différences importantes entre *T.salsuginea* contrôle et *T.salsuginea* stressé avec 150mM de NaCl, on constate que le flux électronique excédentaire semble plus important à fortes intensités lumineuses chez les plants de *T.salsuginea* contrôle.

Discussion

Vers une nouvelle méthode d'étude de la distribution des électrons photosynthétique vers les différents accepteurs.

Dans l'étude de la photosynthèse, de nombreux appareils de mesures et techniques ont été développées ces 50 dernières années dans le but d'étudier plus en détail le phénomène. Il

est maintenant possible de mesurer la photosynthèse avec précision par la mesure de l'assimilation du CO₂ ou le rejet d'O₂. Il est possible de calculer la photorespiration à partir de plusieurs modèles (Farquhar *et al.*, 1980; Epron *et al.*, 1995), de mesurer la respiration à l'obscurité et d'estimer la respiration à la lumière (Laisk, 1977). Il est possible de mesurer la fluorescence chlorophyllienne, d'en déduire l'activité des photosystèmes et d'estimer le flux électronique non cyclique total (Genty *et al.*, 1989). En revanche dans le cas de l'étude des stress abiotiques, il est coutume dans la littérature de lire que les stress abiotiques provoquent un stress oxydant du fait d'un excès en électrons photosynthétiques (Czarnocka and Karpiński, 2018) sans que cet excès d'électrons soit pour autant directement quantifié. A défaut du calcul des électrons excédentaires, l'étude du système antioxydant ou la mesure des dommages liés au stress oxydant tels que la peroxydation des lipides sont d'avantage utilisés pour caractériser la résistance d'une plante à un stress abiotique causant un stress oxydant (Noctor *et al.*, 2016).

Nous avons donc voulu mettre au point une méthode qui permettrait de déterminer la distribution des électrons entre les différents accepteurs, notamment l'assimilation du CO₂, la photorespiration et les voies alternatives incluant le cycle de Mehler, la valve malate, la PTOX,...

Travaillant avec un analyseur de gaz à infra-rouge permettant la mesure de l'assimilation du CO₂ couplé à un module de mesure de la fluorescence chlorophyllienne nous étions en mesure de connaître l'assimilation du CO₂ ainsi que le Φ PSII (par le biais de la fluorescence chlorophyllienne selon (Genty *et al.*, 1989)). Le point de départ de l'établissement de notre méthode a été la méthode développée par (Krall and Edwards, 1992) pour estimer le flux électronique total ainsi que les flux allant à la carboxylation et à l'oxygénation de la rubisco par (Epron *et al.*, 1995).

L'article d'origine, s'il donne une méthode théorique pointe toute fois que la précision de l'approche développée par (Krall and Edwards, 1992) devait encore être déterminée.

Comme il a pu être vu dans les résultats, les données ainsi calculées sont en partie faussées. C'est particulièrement visible sur les données d' $J_{t_{\text{Licor}}}$ où comme on l'a vu, on se retrouve avec une différence dans l'azote entre le $J_{t_{\text{Licor}}} - 4 \times (A_N + R_L)$ non nulle (figure 47). Hors une différence nulle est ce à quoi on pourrait s'attendre dans l'azote dans la mesure où dans ces conditions la photorespiration est nulle (Somerville and Ogren, 1980; Somerville and William, 1981). Bien que dans l'atmosphère à des concentrations très forte en CO₂ auxquelles on n'a en théorie pas non plus de photorespiration (Krall and Edwards, 1992) on a cette fois bien une différence nulle (figure 47).

Ces résultats qui ne correspondent pas à ce qui est attendu tendent à montrer que le calcul n'est pas tout à fait adapté pour *Soldanella alpina* sur laquelle on travaille. Une explication évoquée est le fait que les calculs selon (Krall and Edwards, 1992) se basent sur la

fluorescence chlorophyllienne. Hors on sait que cette mesure ne se fait que sur les premières couches cellulaires et dans le cas de feuilles épaisses (comme c'est le cas chez *Soldanella alpina* (Laureau *et al.*, 2015b) on se retrouve ainsi avec un ϕPSII caractéristique seulement d'une partie de la feuille et donc potentiellement faussé par rapport à l'utilisation réelle que la plante fait de la luminosité incidente.

Pour prendre en compte l'épaisseur de la feuille on s'est intéressé à une autre méthode développée cette fois par (Cornic and Briantais, 1991) et basée sur le ϕCO_2 plutôt que sur le ϕPSII comme chez (Krall and Edwards, 1992). Dans cette méthode on corrèle le ϕCO_2 mesuré dans l'azote avec le ϕPSII sous les mêmes conditions. (Cornic and Briantais, 1991) Cette corrélation a été supposée linéaire et a été appliquée pour calculer les flux électroniques chez *Phaesolus vulgaris* L. (Cornic and Briantais, 1991) et *Ranunculus glacialis* (Laureau *et al.*, 2013). Comme vu sur la figure 48, nous n'avons pas vraiment trouvé une corrélation linéaire du fait d'aberrations entre un modèle linéaire et les données obtenues au niveau des valeurs extrêmes. Les meilleures corrélations que l'on ait trouvées sont une corrélation quadratique pour les courbes d'assimilations en fonction de l'intensité lumineuse et une corrélation sigmoïde pour les courbes d'assimilations en fonction de la pression partielle en CO_2 . Ces courbes de calibrations ont ensuite été testées dans une atmosphère avec de l'azote. Nous avons ainsi recalculé le ϕCO_2 à l'aide du ϕPSII et utilisé le ϕCO_2 ainsi corrigé pour calculer J_t en supposant que 4 électrons sont nécessaires pour l'assimilation d'une molécule de CO_2 . On a ainsi fait le calcul en prenant en compte les courbes de calibration $\phi\text{CO}_2/\phi\text{PSII}$ et un nombre de 4 électrons pour la fixation d'une molécule de CO_2 par le biais de la photosynthèse. Afin de vérifier que l'usage des courbes de calibration permet cette fois effectivement d'avoir un recalcul du flux électronique total plus correct, on calcule à nouveau la différence $J_t - 4 \times (A_N + R_L)$ en prenant en compte toutes les courbes de calibration possible : linéaire, quadratique, sigmoïde ainsi que $J_{t\text{Licor}}$ calculé selon (Krall and Edwards, 1992) (figure 50). A l'aide de ce recalcul, on constatait que dans les courbes azote, $J_{t\text{Quadratique}} - 4 \times (A_N + R_L)$ était proche de zéro pour les courbes en fonction de l'intensité lumineuse et $J_{t\text{sigmoïde}} - 4 \times (A_N + R_L)$ pour les courbes en fonction de la concentration partielle en CO_2 .

C'est donc bien les courbes de calibration avec respectivement une corrélation quadratique et sigmoïde qui permettent les meilleurs recalculs pour le flux électronique total correspondant respectivement aux courbes d'assimilations en fonction de l'intensité lumineuse et d'assimilations en fonction de la pression partielle en CO_2 . On a ainsi pu calculer à l'aide des courbes de calibration établies, le ϕCO_2 hypothétique correspondant au ϕPSII dans l'atmosphère et sous l'hypothèse de 4 électrons nécessaires pour la fixation d'une molécule de CO_2 , recalculé à partir de ce ϕCO_2 le flux électronique total correspondant.

A partir de cette mesure, on peut maintenant mesurer la distribution des électrons entre l'assimilation du CO_2 et la photorespiration. On a dans un premier temps pour cela considéré la méthode donnée par (Epron *et al.*, 1995) basée sur le calcul du J_t et les mesures d'assimilations du CO_2 . Cette première méthode part du postulat d'une distribution des

électrons seulement entre la photosynthèse et la photorespiration à raison de 2/3 pour la carboxylation et 1/3 pour l'oxygénation de la rubisco. Cette méthode donne une photorespiration comprise entre 40 et 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figure 46). Ce résultat est bien supérieur au transport électronique d'environ 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ calculé pour la photorespiration en considérant $(A_{N(N_2)} - A_{N(atm)}) \times 4$ (figure 51). On peut se demander si cette méthode est véritablement adaptée à notre modèle dans la mesure où toute possibilité d'un flux alternatif est écartée de facto ici. La photorespiration de manière générale est considérée comme provoquant une diminution de l'assimilation du CO_2 comprise entre 15% (Ogren, 1984) et 50 % (Gerbaud and André, 1987). (Sharkey, 1988) qui s'est intéressé à la question conclut à une photorespiration diminuant en moyenne de 26% l'assimilation du CO_2 . Chez *Ranunculus glacialis* (Laureau *et al.*, 2013) trouve une photorespiration de l'ordre de 40%. Ici, *Soldanella alpina* avec un J_o de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour un J_t d'environ 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on aurait donc une photorespiration qui diminue de 50% l'assimilation du CO_2 ce qui semble important au regard du facteur de spécificité apparent de 108 qui ne semble pas indiquer une affinité particulièrement prononcée de la Rubisco pour le dioxygène. Ce constat renforce notre idée selon laquelle la méthode d'(Epron *et al.*, 1995) ne donne pas un résultat correct pour *Soldanella alpina*.

Il existe une deuxième méthode basées sur le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) qui utilise le facteur de spécificité de la Rubisco et que nous avons donc décidé d'utiliser pour calculer ETR_o et ETR_c . On a ainsi calculé le facteur de spécificité apparent de la Rubisco et la respiration à la lumière selon la méthode de (Laisk, 1977) en utilisant les courbes d'assimilations en fonction de la concentration interne en CO_2 . Puis on en a déduit les vitesses de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco. En supposant enfin la nécessité de 4 électrons pour la fixation d'une molécule de CO_2 ou d' O_2 dans le cadre de la photosynthèse et de la photorespiration respectivement, on obtient ainsi ETR_c et ETR_o (figure 55).

En comparant les deux méthodes pour ce qui est de *Soldanella alpina*, on constate que la deuxième méthode basée sur le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) est celle qui correspond à la différence $(A_{N(N_2)} - A_{N(atm)}) \times 4$ (figure 51). La première méthode (Epron *et al.*, 1995) résulte en une surestimation des flux allant à l'oxygénation de la Rubisco. Cela nous amène à penser que c'est peut être l'hypothèse d'une absence de flux alternatifs ou du moins d'un flux alternatif négligeable qui pose ici problème. La différence assez importante entre le calcul selon (Farquhar *et al.*, 1980) et celui selon (Krall and Edwards, 1992) pose l'hypothèse d'une distribution du flux électronique à d'autres flux que la photorespiration ou la photosynthèse. Ce flux est par la suite appelé flux excédentaire.

Dès lors, on peut donc calculer un flux électronique excédentaire sur une méthode similaire à celle utilisée auparavant pour la Renoncule des glaciers (Laureau *et al.*, 2013). On considère ainsi le flux électronique restant, une fois soustrait le flux électronique allant à la photosynthèse et à la photorespiration (calculé selon (Farquhar *et al.*, 1980) au flux électronique total (obtenu par recalcul à l'aide des courbes de calibration $\phi\text{CO}_2/\phi\text{PSII}$

correspondant le mieux aux données). Contrairement à (Laureau *et al.*, 2013), on divise cette fois la différence par 4 pour prendre en compte le fait que le flux électronique total a été calculé à partir du ϕCO_2 et sous l'hypothèse de 4 électrons pour la fixation d'une molécule de CO_2 . Cette hypothèse de 4 électrons n'est pas correcte pour les flux alternatifs (Kramer and Evans 2011) qui utilisent l'oxygène comme accepteur tels que la PTOX, la valve malate, le cycle Mehler, d'où la nécessité d'une correction. Pour *Soldanella alpina* on constate qu'il y a un excès de l'ordre d'une dizaine d'électrons donc non négligeable dans la mesure où cela est dans le même ordre de grandeur que le flux allant à la photorespiration.

Tout au long du recalcul, on a utilisé une respiration à la lumière mesurée grâce à la méthode de (Laisk, 1977) à l'aide de courbes d'assimilations du CO_2 en fonction de la pression partielle interne en CO_2 à différentes intensités lumineuses. Cette méthode permet de connaître également le gamma star qui sert au calcul du facteur de spécificité apparent de la Rubisco (Laing *et al.*, 1974) et dont on a besoin pour appliquer le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980). La méthode de (Laisk, 1977), si elle est reconnue pour la détermination de la respiration à la lumière peut être assez imprécise dans la pratique du fait de la détermination « à l'œil » du point de compensation de la photosynthèse. Nous nous sommes donc appuyés sur une amélioration de la méthode de détermination du point de compensation proposée par (Walker and Ort, 2015).

Bien que cette nouvelle méthode de détermination du point de compensation de la photosynthèse soit plus précise et permet de s'affranchir d'avantage du biais expérimentateur tout en ayant une meilleure répétabilité, il n'en reste pas moins que les résultats donnés par la méthode de (Laisk, 1977) peuvent être discutés. En effet, il existe plusieurs méthodes d'estimations de la respiration à la lumière (Tcherkez *et al.*, 2017) chacune avec ses avantages et ses inconvénients. Les avantages principaux de la méthode (Laisk, 1977) résident dans le fait qu'elle est relativement simple à mettre en place avec les équipements dont nous disposons, peu coûteuse et permet d'avoir à la fois une information sur la respiration à la lumière et sur le gamma star (Tcherkez *et al.*, 2017). En revanche bien qu'ancienne et toujours admise comme valide par la communauté scientifique, la méthode de (Laisk, 1977) possède également des désavantages : elle nécessite de travailler à des pressions partielles en CO_2 très faibles ce qui rend la mesure sensible à la moindre fuite (limité par l'emploi d'une chambre de mesure close et l'utilisation d'un sac pour rendre le plus hermétique possible la tête du Licor où se fait la mesure) ou mauvais calibrage de l'appareil de mesure, le point de compensation n'est pas toujours facilement déterminable (défaut corrigé par l'emploi de la méthode de (Walker and Ort, 2015)), elle fait l'hypothèse d'une respiration à l'obscurité indépendante du CO_2 et elle est affectée par la conductance interne et la refixation de CO_2 (Tcherkez *et al.*, 2017).

Ses dernières années d'autres méthodes ont été mises au point pour mesurer la respiration à la lumière. Parmi ses nouvelles méthodes, on note notamment celles de Gong (2015) et Loreto (2001) basées sur l'étude du déséquilibre isotopique. Ses méthodes nécessitent

un équipement spécifique et possèdent comme désavantage d'être globalement plus coûteuses que la méthode de (Laik, 1977). Une comparaison entre la méthode de Gong (2015) et la méthode de (Laik, 1977) montre que cette dernière sous-estime systématiquement la respiration à la lumière de $0,4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ par rapport à l'étude du déséquilibre isotopique (Gong *et al.*, 2018). On retrouvait également une différence au niveau du gamma star de l'ordre de $5 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ suivant que l'on travaillait avec les courbes d'assimilations en fonction de la pression partielle en CO_2 ou en fonction de la fraction molaire de CO_2 dans le chloroplaste. (Gong *et al.*, 2018) Nous avons travaillé sciemment avec les courbes d'assimilation en fonction de la pression partielle en CO_2 interne pour la mesure du gamma star bien que les résultats ainsi obtenus soient moins corrects. Cependant, nous avons estimé que la plante étant acclimatée longuement, la pression partielle interne étant stable tout au long de la mesure et la conductance stomatique étant correcte, il était tout de même raisonnable de travailler selon cette méthode. De plus, travailler avec cette hypothèse de départ semble être admis comme raisonnable même dans des articles techniques tel que (Bellasio *et al.*, 2016).

Cependant pour les raisons évoquées plus tôt, nous avons voulu vérifier la sensibilité de notre calcul du flux électronique excédentaire en tenant compte des biais induit par l'emploi de la méthode (Laik, 1977). Ainsi on a étudié des cas extrêmes d'une respiration à la lumière nulle ou au contraire égale à la respiration à l'obscurité ou encore le cas d'une erreur de plus ou moins $6 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ pour le gamma star. Comme il est possible de le voir dans les résultats, notre méthode est peu sensible aux différentes erreurs qui pourraient être faites tant au niveau de l'appréciation du point de compensation de la photosynthèse qu'au niveau de la mesure de la respiration à lumière. Les biais potentiellement dus à l'emploi de la méthode de (Laik, 1977) semblent donc n'avoir qu'une conséquence minime par rapport au constat qu'il est fait de l'existence d'un flux excédentaire non nul chez *Soldanella alpina*. On pourrait donc en conclure que la méthode est robuste.

De plus, même en considérant les hypothèses d'erreurs de calculs ou de mesures grossières, il reste chez *Soldanella alpina* un flux électronique en excès non négligeable d'au minimum $8 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ce qui va à l'encontre des hypothèses précédentes considérant que les flux alternatifs sont suffisamment faible pour être négligeable.

L'étude d'*A.thaliana* et *T.salsuginea* en complément pour la validation du modèle est également concluante. Cette validation a été souhaitée dans la mesure où leurs physiologies sont bien connues et étudiées (Gong *et al.*, 2005; Volkov and Amtmann, 2006; Alemán *et al.*, 2009; Stepien and Johnson, 2009; Arbona *et al.*, 2010; Gamburg *et al.*, 2011; Bartels and Dinakar, 2013; Benina *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Sharma, 2014), notamment en réponse à plusieurs stressés abiotiques contrairement à la physiologie des plantes alpines, existant dans des conditions naturelles stressantes et dont la physiologie est moins connue. De plus chez *A.thaliana* tout comme chez *Phaseolus vulgaris* L on peut faire l'hypothèse raisonnable qu'il n'y a pas de flux excédentaires. (Cornic and Briantais, 1991)

De nombreuses études ont pu porter plus spécifiquement sur la comparaison des résistances au stress salin chez *A.thaliana* et *T.salsuginea* (Zhu, 2001; Gong *et al.*, 2005; Volkov and Amtmann, 2006; Stepien and Johnson, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Qiuying *et al.*, 2010; Bartels and Dinakar, 2013; Francisco and Hayet, 2016) Il en ressort que *A.thaliana* est peu voire pas résistante au stress salin qui cause chez elle une déshydratation et un stress oxydant important. On retrouve des résultats cohérents par rapport à (Stepien and Johnson, 2009) avec des plantes *A.thaliana* traitée au NaCl dont la conductance stomatique est drastiquement diminuée (figure 61) en réponse à la déshydratation et dont la photosynthèse est également très inhibée (figure 60). *T.salsuginea*, en revanche, est une halophyte capable de résister au stress salin grâce à un ensemble de processus incluant des transporteurs spécifiques au niveau racinaire pour maintenir l'homéostasie (Volkov and Amtmann, 2006; Wang *et al.*, 2006), un contenu en antioxydant plus important pour combattre la formation de ROS (Quattrocchio *et al.*, 2006; Francisco and Hayet, 2016) et l'implication de flux alternatif vers la PTOX comme défendu par (Stepien and Johnson, 2009).

Avec nos recalculs on trouve pour *A.thaliana* un flux électronique beaucoup plus faible chez les plantes traitées que chez les contrôles. De fait on constate une diminution importante du nombre d'électrons allant à la photosynthèse comme à la photorespiration chez *A.thaliana* traitée en comparaison avec le contrôle. Pour ce qui est du nombre d'électrons excédentaires : on retrouve un petit flux d'électron excédentaire d'au maximum $2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ chez les *A.thaliana* contrôles alors que chez *A.thaliana* traitée au NaCl il n'y a pas de flux électroniques excédentaires.

Chez *T.salsuginea* on trouve un flux électronique total un peu plus faible chez les plantes traitées par rapport aux contrôles. Si on considère les calculs d'ETR_c et ETR_o selon (Farquhar *et al.*, 1980), on constate que cette diminution du flux électronique total provient d'une diminution du flux électronique à la carboxylation de la Rubisco. Le flux électronique excédentaire est somme toute égal dans les deux conditions bien qu'à des intensités lumineuses importantes, on a un flux électronique plus important chez les *T.salsuginea* stressée par rapport au contrôle.

Comme on le disait plus haut, on a longtemps considéré que le stress oxydant venait d'un excès d'électrons. Chez *A.thaliana* contrôle en effet, on n'a pas de stress et très peu d'électrons en excès. En revanche, chez *A.thaliana* traitée, on a du stress mais pas pour autant un nombre significatif d'électrons en excès. Il est possible au vu du flux électronique total faible que le stress appliqué pendant une semaine ait été suffisant pour déclencher une réponse, comme de la photoinhibition qui aboutirait à la mort de la plante à long terme mais également à une limitation du flux électronique de manière générale et du flux excédentaire de manière particulière. Cependant le Fv/Fm (données non montrées) n'est pas beaucoup plus faible chez les plantes stressées au NaCl par rapport aux plantes contrôles. Le plus faible transport électronique chez les plantes stressées avec 150mM de NaCl chez *A.thaliana* peut

en revanche s'expliquer par une induction plus rapide et plus forte du NPQ surtout à faibles et moyennes intensités lumineuses (données non montrées).

Plusieurs articles s'étant penchés sur la réponse de *T. salsuginea* pensent pour expliquer la résistance de cette espèce au stress salin à une pré-acclimatation basée sur une production accrue de peroxyde d'hydrogène même en condition non stressante (Quattrocchio *et al.*, 2006; Wiciaz *et al.*, 2015). Cette production de H_2O_2 se fait non pas grâce au cycle de Mehler mais au niveau du PSII et correspond à un flux d'électron vers l'oxygène. Cette production augmente avec le stress (Wiciaz *et al.*, 2015). (Stepien and Johnson, 2009) proposent l'action de la protéine PTOX dont l'activité pourrait prendre en charge une partie du flux électronique afin d'assurer la réoxydation du pool de quinone. L'activité de la PTOX était chez (Stepien and Johnson, 2009) plus importante chez les plantes stressées par rapport aux contrôles. (Stepien and Johnson, 2009) et (Wiciaz *et al.*, 2015) ayant obtenus des résultats différents pour l'activité PTOX et n'ayant pas utilisé la même méthode, il est impossible de conclure de façon certaine au mécanisme à l'œuvre. Cependant les deux hypothèses ne font que proposer un mécanisme de flux alternatif permettant à *T. salsuginea* de réoxyder les accepteurs de sa chaîne de transfert non cyclique des électrons pour la photosynthèse. Par le biais de notre calcul, on constate la présence d'un flux électronique excédentaire dont l'évolution est cohérente avec les hypothèses de (Wiciaz *et al.*, 2015) comme de (Stepien and Johnson, 2009).

Nous avons donc mis au point une méthode qui semble robuste et dont l'application à un modèle connu tel que *A. thaliana* et *T. salsuginea* soumis à un stress salin reste globalement cohérent par rapport aux études faites actuellement sur le sujet.

Conclusion

Soldanella alpina est une plante alpine qui garde ses feuilles vertes pendant la période hivernale (où celle-ci sont enneigées). Au moment de la fonte des neiges, les feuilles passent d'une condition extrême avec des températures basses et peu de lumière à une situation également stressante de luminosité intense accompagnée de températures élevées. Dans ces conditions hautement stressantes on s'attend à avoir un stress oxydant important qui trouverait son origine dans un flux électronique excédentaire.

Ne disposant pas de méthodes permettant de recalculer la répartition du flux électronique non cyclique de la photosynthèse vers les différents accepteurs qui prennent également en compte la présence de flux alternatif, nous avons adapté les méthodes existantes pour parvenir à nos fins. Nous avons ainsi considéré différentes méthodes de calcul de l'ETR et différentes méthodes d'estimation des flux vers la carboxylation et l'oxygénation de la rubisco. Nous avons conclu que la meilleure méthode consistait en une

adaptation de la méthode de (Cornic and Ghashghaie, 1991) prenant en compte une corrélation quadratique ou sigmoïde et non plus linéaire entre ϕ_{PSII} et ϕ_{CO_2} pour le recalcul de J_t . Le modèle de (Farquhar *et al.*, 1980) donne ensuite de bien meilleurs résultats que la méthode d'(Epron *et al.*, 1995) pour le calcul des flux électroniques allant à l'oxygénation (ETRo) et à la carboxylation (ETRc) de la Rubisco.

Nous avons défini le flux excédentaire en excès comme étant $J_t - (ETR_c + ETR_o)$, le tout divisé par 4 pour prendre en compte le fait que les flux alternatifs consomment généralement entre 1 et 2 électrons alors qu'il en faut 4 pour la photosynthèse ou la photorespiration.

L'application du modèle obtenu aux jeunes feuilles de *Soldanella alpina* montre la présence d'un flux électronique faible mais non négligeable. Le modèle a été éprouvé pour prendre en compte les diverses incertitudes dues à l'expérimentation en elle-même mais également aux hypothèses posées. Cette mise à l'épreuve du modèle montre que notre calcul est robuste et résiste aux variations (même importante) des paramètres clef du recalcul.

Il a également été fait une vérification du modèle sur une plante à la physiologie mieux connue que *Soldanella alpina*. *A.thaliana* et de *T.salsuginea* traitées au NaCl ou laissées en condition contrôle ont été choisies pour cela.

L'étude du flux excédentaire chez *A.thaliana* permet de comprendre que l'assimilation du CO_2 n'est pas inhibée par un flux excédentaire participant à la formation de ROS contrairement à ce que l'on peut fréquemment retrouver dans la littérature. Il se peut néanmoins que l'étude, faite au bout d'une semaine de stress, ait été trop tardive pour observer le phénomène. Chez les plantes contrôle dans lesquelles l'absence de flux alternatif est une hypothèse raisonnable, on retrouve également une absence d'électrons en excès.

Chez *T.salsuginea* on observe la présence d'un flux électronique en excès exacerbé en condition de stress salin qui est cohérent avec les hypothèses en vigueur d'une pré-acclimatation au stress chez cette espèce par le biais de la production de ROS au niveau du PSII et de l'activité PTOX comme valve de sécurité.

Chapitre n°4 :

**Application du modèle pour estimer la distribution des électrons durant la vie des feuilles
chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina***

Comme présenté en introduction, certaines feuilles de *Soldanella alpina* et *Geum montanum* sont capable de survivre au minimum pendant deux périodes de végétation, seulement interrompue d'une longue période d'enneigement. On a ainsi au niveau de la plante des feuilles, ayant des âges différents, soumises à des contraintes différentes et dont on peut s'attendre à ce que l'effort d'acclimatation soit différent. On fait ainsi la distinction entre les feuilles jeunes qui se sont formées après la fonte du couvert neigeux, les feuilles sous la neige qui ont été formée l'année précédente et viennent de subir une période longue dans l'obscurité et le froid et enfin les vieilles feuilles qui avec la fonte des neiges sont soumises à un transfert rapide de l'obscurité avec des températures basses à des intensités lumineuses importantes avec des températures hautes.

On a donc essayé de voir si l'acclimatation des plantes aux variations subies tout au long des différentes saisons était accompagnée d'un changement de la distribution des flux électroniques entre les différents accepteurs possible et si cette distribution pouvait potentiellement augmenter le risque de formation de ROS par les plantes.

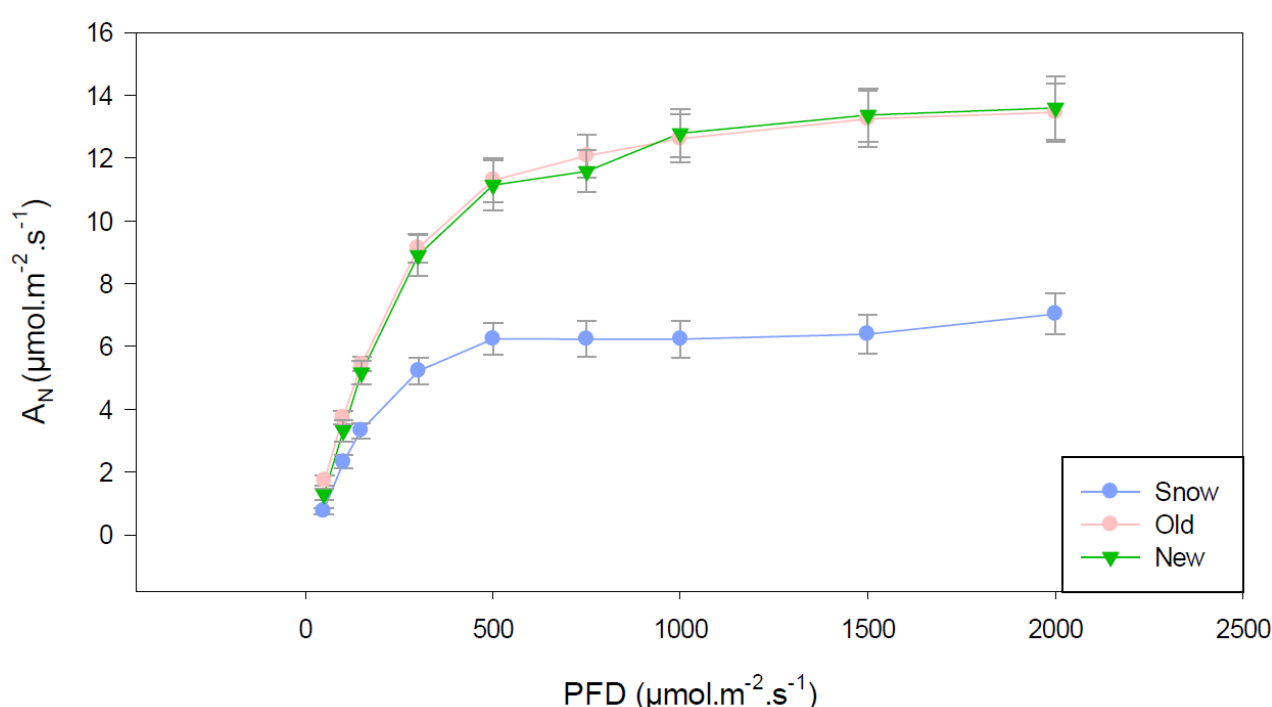


Figure 66: assimilation de CO_2 au niveau des feuilles de *Geum montanum* âgées (Old), nouvellement formées (New) ou sous la neige (Snow) en fonction de l'intensité lumineuse.

Conformément au fonctionnement de la photosynthèse, on observe dans toutes les conditions, une augmentation de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse jusqu'à ce que la lumière devienne saturante. On note chez *Geum montanum* que l'assimilation est très forte chez les feuilles jeunes et âgées et beaucoup plus faible au contraire chez les feuilles des plantes encore sous la neige au moment du prélèvement. En

effet les jeunes feuilles s'étant formée à la suite de la fonte des neiges comme les feuilles âgées ayant résistées à une période d'enneigement au moins montrent une assimilation de CO_2 similairement élevée (figure 66).

En revanche, les feuilles étudiées sous la neige présentent une photosynthèse plus faible de l'ordre de 50%

En plus d'avoir une photosynthèse globalement plus faible (de manière générale comme en terme de maximum), il semble également que l'assimilation du CO_2 des feuilles mesurées sous la neige sature plus rapidement que celle des feuilles âgées et les feuilles jeunes. On peut en effet voir qu'à partir de $500 \mu\text{mol}$ de $\text{photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ la photosynthèse des feuilles sous la neige atteints déjà un plateau alors qu'il faut attendre de passer le seuil de $1000 \text{ photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour arriver à saturation dans le cas des feuilles âgées et nouvellement formées.

Sur les courbes effectuées en fonction de la pression partielle en CO_2 (figure 67), on note que l'assimilation du CO_2 chez les feuilles sous la neige est également plus faible de manière significative en comparaison avec ce que l'on observe par ailleurs chez les feuilles jeunes et âgées, même à de fortes pressions partielles en CO_2 . Aux pressions partielles auxquelles on travaille pour les courbes d'assimilations à la lumière on constate qu'il y a en effet une différence marquée entre les feuilles de neige dont l'assimilation est de 50% plus faible que celle des feuilles âgées et jeunes. Cette observation renforce l'idée selon laquelle la photosynthèse chez les feuilles sous la neige est plus faible que dans les autres conditions, sans que cela ait à voir avec la disponibilité du dioxyde de carbone.

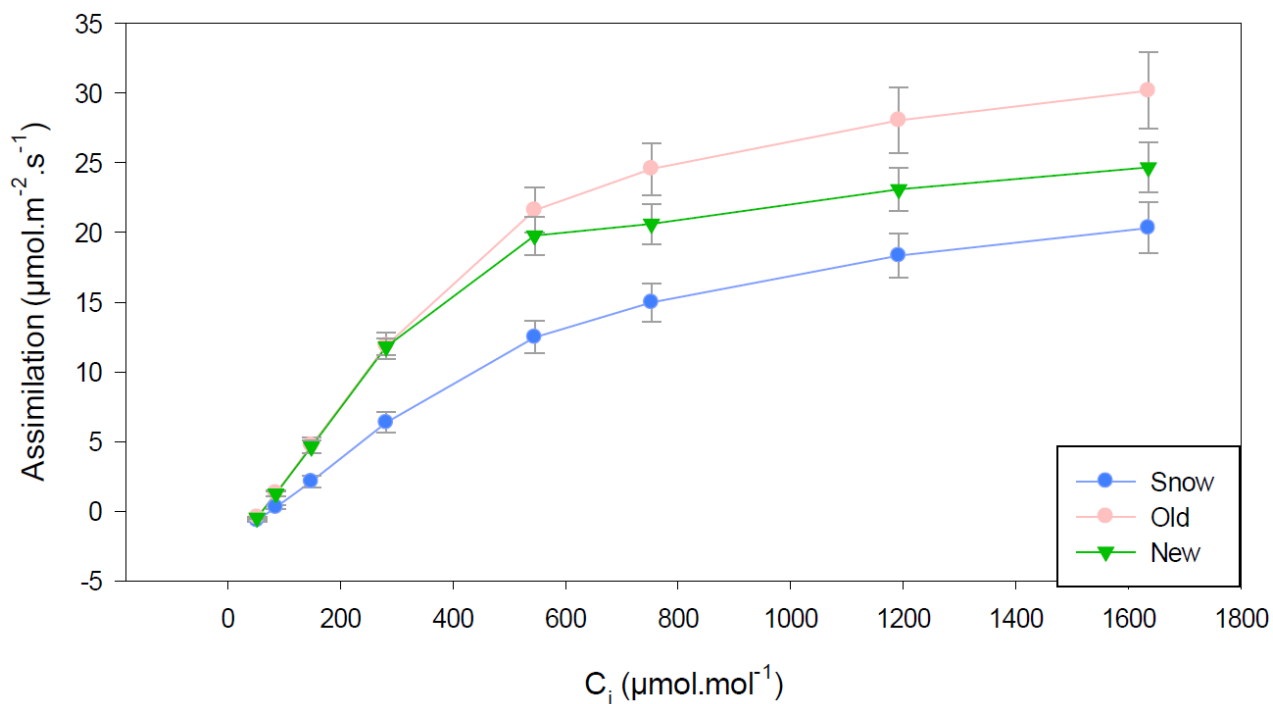


Figure 67: assimilation de CO_2 au niveau des feuilles de *Geum montanum* âgées (Old), nouvellement formées (New) ou sous la neige (Snow) en fonction de la pression partielle en CO_2 interne.

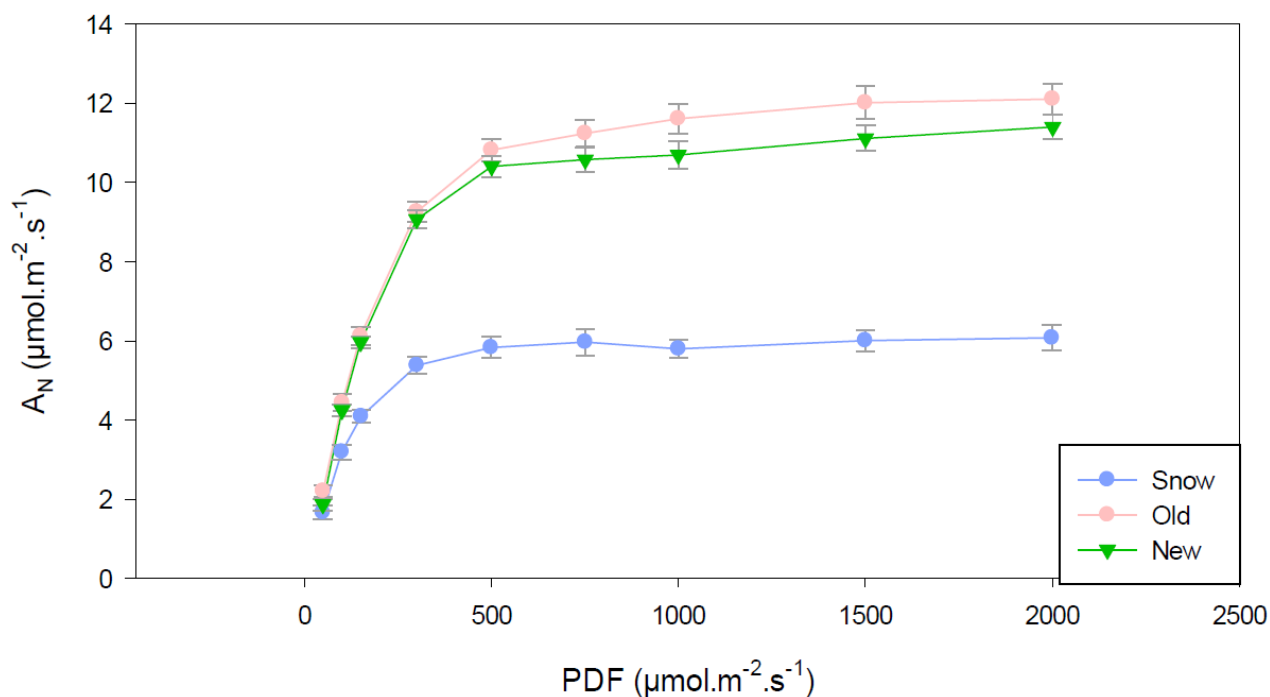


Figure 68: assimilation de CO_2 au niveau des feuilles de *Soldanella alpina* âgées (Old), nouvellement formées (New) ou sous la neige (Snow) en fonction de l'intensité lumineuse.

Pour la photosynthèse chez *Soldanella alpina* on voit le même résultat que chez *G. montanum*. Mais la photosynthèse est cette fois la plus forte en moyenne chez les feuilles âgées (figure 68). Une intensité lumineuse saturante est atteinte à partir de $750 \mu\text{mol}$ de $\text{photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les feuilles jeunes et les feuilles âgées et à partir de $500 \mu\text{mol}$ de

photon.m⁻².s⁻¹ pour les feuilles prélevées sous la neige. De la même façon que chez *G.montanum*, la photosynthèse est plus élevée au niveau des feuilles étant dans des conditions moins stressantes comme c'est le cas pour les feuilles jeunes et celles qui sont âgées alors qu'au contraire elle est plus faible chez les feuilles prélevées sous la neige.

Le transport électronique total présenté ici a été calculé en suivant la même méthode que celle discutée au chapitre n°3 en se basant sur une correction polynomiale quadratique ($J_{\text{Tquadratique}}$) entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} , la corrélation étant recalculée pour chaque condition. De plus, le gamma star et le facteur de spécificité de la Rubisco ont également été déterminé pour chaque condition.

Les valeurs moyennes obtenues pour le gamma star, le facteur de spécificité apparent de la Rubisco, les respirations à la lumière ainsi que les équations de corrélation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} sont données dans le tableau suivant pour chaque condition:

Tableau 1: Tableau récapitulatif des données d'inhibition de la respiration à la lumière, du gamma star, du facteur de spécificité de la Rubisco et des équations de corrélation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* aux différents stades de vie étudiés.

Espèce	Condition	Inhibition de la respiration à la lumière calculé selon (Rafael <i>et al.</i> , 1995)	Gamma star	Facteur de spécificité apparent de la Rubisco	Equation de la corrélation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2}
<i>Soldanella alpina</i>	Feuilles jeunes (n=13)	30,2%	36 ± 1,6	108	$\Phi_{\text{CO}_2} = 0,002 + 0,1 \times \Phi_{\text{PSII}} + 0,2 \times \Phi_{\text{PSII}}^2$
	Feuilles sous la neige (n=8)	12,4%	33 ± 1,55	118	$\Phi_{\text{CO}_2} = 0,003 + 0,068 \times \Phi_{\text{PSII}} + 0,184 \times \Phi_{\text{PSII}}^2$
	Feuilles vieilles (n=10)	13,7%	41,6 ± 1,92	94	$\Phi_{\text{CO}_2} = 0,003 + 0,091 \times \Phi_{\text{PSII}} + 0,095 \times \Phi_{\text{PSII}}^2$
<i>Geum montanum</i>	Feuilles jeunes (n=5)	81,6%	47,4 ± 4,2	80,27	$\Phi_{\text{CO}_2} = 0,0056 + 0,058 \times \Phi_{\text{PSII}} + 0,12 \times \Phi_{\text{PSII}}^2$
	Feuilles sous la neige (n=5)	55%	31,2 ± 0,32	127,19	$\Phi_{\text{CO}_2} = 0,006 + 0,034 \times \Phi_{\text{PSII}} + 0,197 \times \Phi_{\text{PSII}}^2$

	Feuilles vieilles (n=8)	39,8%	41,3±1,8	97,52	ϕCO_2 $= 0,0054$ $+ 0,0659$ $\times \phi PSII$ $+ 0,0856$ $\times \phi PSII^2$
--	-------------------------------	-------	----------	-------	---

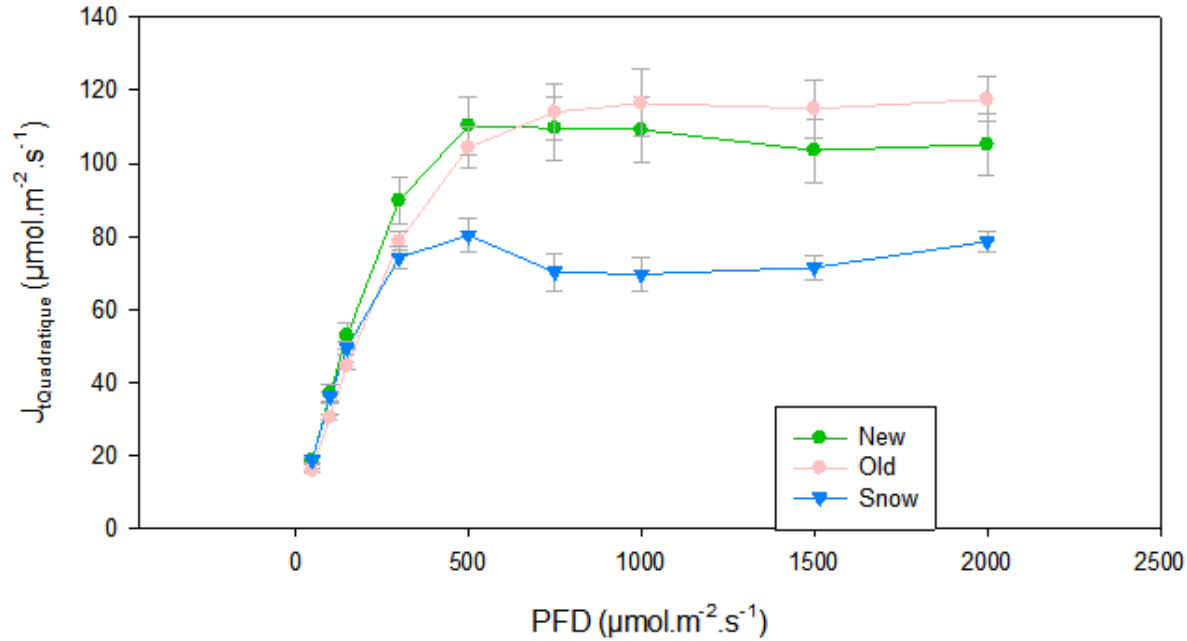


Figure 69: flux électronique total calculé au niveau des feuilles de *Geum montanum* âgées (old), nouvellement formées (new) ou sous la neige (snow) suivant l'équation de la corrélation quadratique entre $\Phi PSII$ et ΦCO_2 (tableau 1) en fonction de l'intensité lumineuse. Dans l'atmosphère

Le constat que l'on peut faire à propos de $J_{Tquadratique}$ rejoint l'observation que l'on faisait au niveau de la photosynthèse : on observe une augmentation progressive du flux électronique total au fur et à mesure de l'augmentation de l'intensité lumineuse et ce, jusqu'à parvenir à un plateau de saturation vers $500 \mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. On observe également, comme pour la photosynthèse, un flux électronique total plus faible pour les feuilles prélevées sous la neige que chez celles qui sont neuves ou alors au contraire les feuilles âgées.

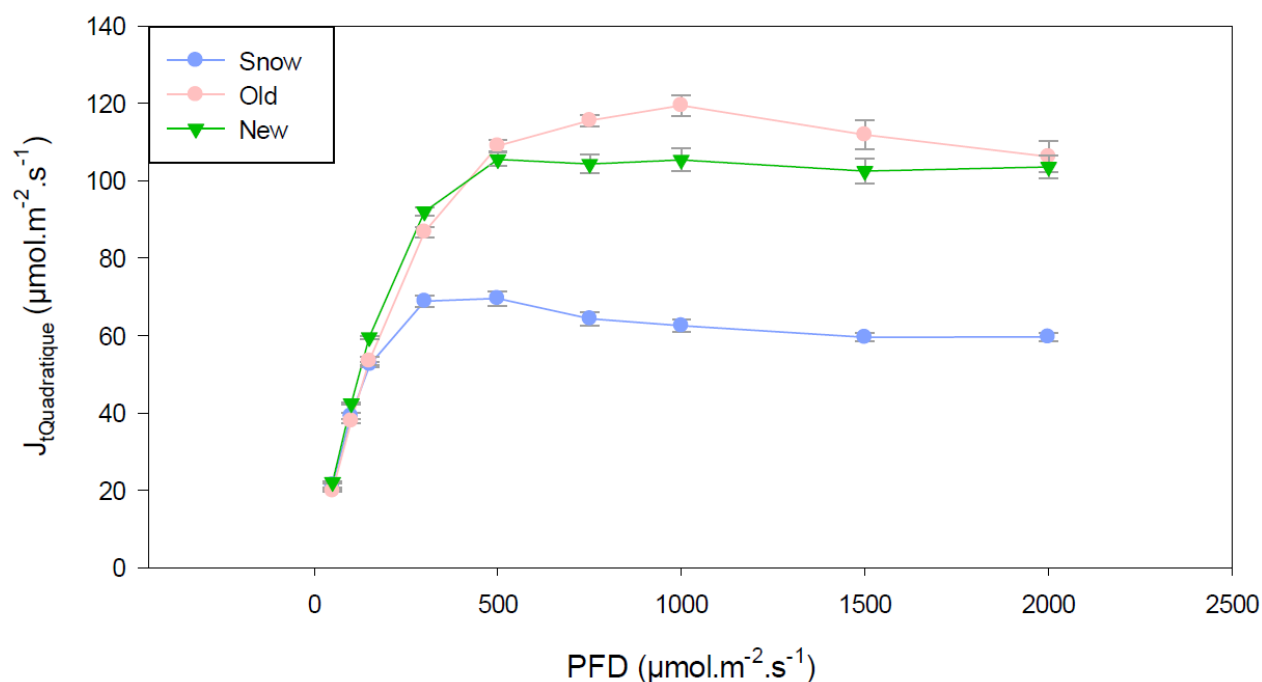


Figure 70: flux électronique total calculé grâce à l'équation de la corrélation quadratique entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} (tableau 1) au niveau des feuilles de *Soldanella alpina* âgées (Old), nouvellement formées (New) ou sous la neige (Snow) en fonction de l'intensité lumineuse. Dans l'atmosphère.

De même que pour *G.montanum*, l'évolution du flux électronique total chez *Soldanella alpina* correspond à l'observation faite sur la photosynthèse : le $J_{TQuadratique}$ augmente au fur et à mesure de l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à arriver à un plateau de saturation à partir de $300 \mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et de $1000 \mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. De la même façon que la photosynthèse est plus importante chez les jeunes et vieilles feuilles de *Soldanella alpina* que chez les feuilles prélevées sous la neige, on retrouve un flux électronique total plus élevé chez les jeunes et vieilles feuilles que chez les feuilles récoltées sous la neige. Le flux électronique total chez les feuilles jeunes et âgées, compris entre 100 et $120 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est similaires à ce qui est observé chez *G.montanum* dans les mêmes conditions.

Le flux électronique chez les plantes dont les feuilles ont été prélevées sous la neige est en revanche très bas en comparaison des autres conditions chez *Soldanella alpina*. Avec seulement environ $70 \mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le flux électronique total est de plus faible chez les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées sous la neige en comparaison avec le flux électronique total calculé au niveau des feuilles de *G.montanum* dans les mêmes conditions.

Une fois mesurée les flux allant respectivement à l'oxygénation et à la carboxylation de la Rubisco, on peut avoir une estimation du flux électronique crée au niveau du PSII mais qui ne va ni à la photosynthèse, ni à la photorespiration.

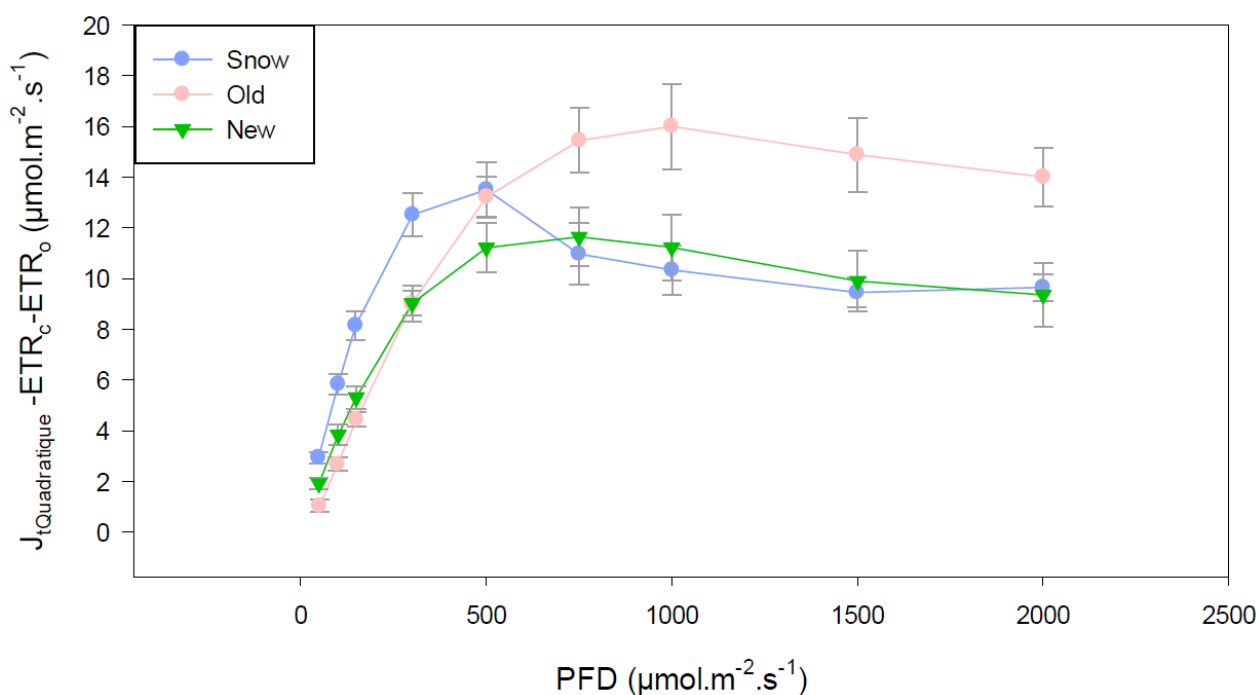


Figure 71 : Flux électronique vers les accepteurs autres que la Rubisco calculé à partir du recalcul quadratique du flux électronique total tel que décrit dans le chapitre n°3 dans les feuilles de *Geum montanum* âgées (old), nouvellement formées (new) ou sous la neige (snow) en fonction de l'intensité lumineuse. Le calcul est obtenu à partir des mesures faites dans l'atmosphère et le flux électronique restant, est divisé par 4.

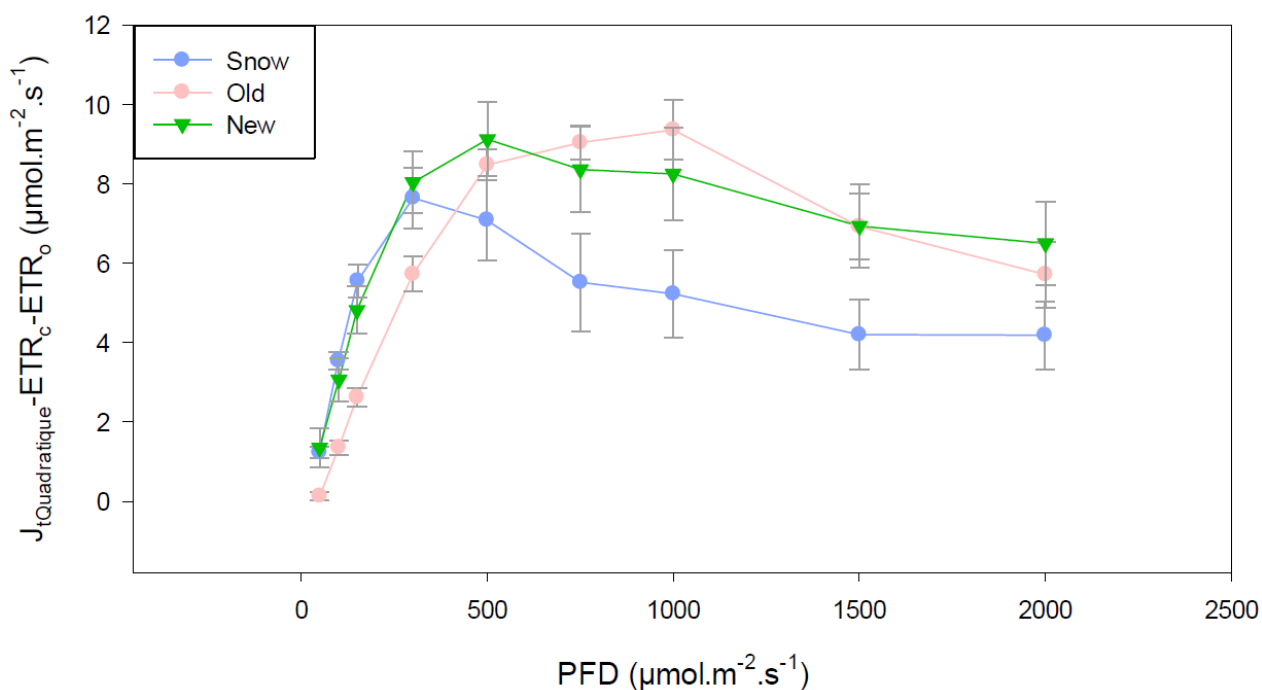


Figure 72: Flux électronique vers les accepteurs autres que la Rubisco calculé à partir du recalcule quadratique du flux électronique total tel que décrit dans le chapitre n°3 dans les feuilles de *Soldanella alpina* âgées (old), nouvellement formées (new) ou sous la neige (snow) en fonction de l'intensité lumineuse. Les calculs sont fait à partir des mesures faites dans l'atmosphère et le flux électronique restant, est divisé par 4.

Chez les feuilles sous la neige de *Geum montanum*, le transport vers les accepteurs autre que la rubisco augmente rapidement à faible lumière jusqu'à $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et

diminue ensuite. Il semble qu'à cette intensité lumineuse, le flux des électrons pour la photosynthèse soit donc mal régulé au niveau du PSII et aille alors alimenter un flux alternatif.

Le flux électronique en excès est similaire chez les jeunes et vieilles feuilles de *Geum montanum* à des intensités lumineuses non saturantes (*i.e.* Inférieures à 500 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A des intensités lumineuses plus importantes, le flux excédentaire chez les feuilles âgées devient plus fort malgré une assimilation également plus importante dans ses conditions chez les feuilles âgées (figure n°66). La différence pourrait être expliquée par une photorespiration plus forte chez les jeunes feuilles, qui consomme donc plus d'électrons, alors que la dissipation de l'énergie excédentaire chez les vieilles feuilles passerait d'avantage par l'utilisation de voies alternatives.

Au contraire de *Geum montanum*, le transport en excès des feuilles jeunes et des feuilles sous la neige de *Soldanella alpina* est similaire jusqu'à 300 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alors que le transport en excès des feuilles âgées est plus faible. Pour des intensités lumineuses plus importantes, le flux électronique excédentaire devient similaire entre les feuilles jeunes et les feuilles âgées alors que pour les feuilles sous la neige, le flux excédentaire est beaucoup plus faible. A chaque fois, le flux excédentaire augmente jusqu'à atteindre un maximum à 300 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les feuilles sous la neige, à 500 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les jeunes feuilles et 1000 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les feuilles âgées avant de diminuer. Pourtant alors que la photorespiration est plus faible chez *Soldanella alpina* que chez *Geum montanum*, on a un flux excédentaire plus faible chez *S.alpina* par rapport à *G.montanum*. En effet, il est compris entre 8 et 10 μmol d'électrons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *Soldanella alpina* et entre 6 et 16 μmol d'électrons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ chez *Geum montanum* passé le point de lumière saturante. Cependant du fait de notre hypothèse ce n'est qu'un minimum. Il faut noter que le flux électronique excédentaire n'est pas maximal à forte lumière mais autour de 500 à 1000 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Chez *Geum montanum* et chez *Soldanella alpina*, des différences s'observent entre la répartition des flux aux différents stades de vie. Chez *Geum montanum*, il y a peu de différences entre les feuilles âgées et jeunes qui allouent un nombre minimal d'électrons vers les accepteurs autre que la Rubisco globalement égal tandis que les feuilles sous la neige semblent allouer un nombre d'électrons moindre vers les voies alternatives.

Chez *Soldanella alpina*, à des intensités lumineuses fortes, les feuilles jeunes et âgées ont un flux électronique en excès supérieur à ce que l'on retrouve chez les feuilles de neige. Les feuilles sous la neige ont, chez *Soldanella alpina*, le flux électronique excédentaire le plus faible malgré une plus faible assimilation. Donc le transport électronique chez les feuilles de neige est régulé en amont de la création du flux électronique *i.e.* au niveau du PSII ou des antennes du LHC.

La diminution de la photosynthèse chez les feuilles sous la neige est-elle due à une limitation en amont du PSII de la conversion d'énergie lumineuse en flux électronique ?

Une des premières choses que l'on peut se demander pour tenter d'expliquer le flux électronique total plus faible chez les feuilles se trouvant sous la neige chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* est : y a-t-il une limitation de la capacité des plantes dans ces conditions à créer un flux électronique au niveau du photosystème II. Pour cela on s'est intéressés à 4 paramètres : la dissipation d'énergie sous forme de chaleur par le biais de l'étude du NPQ, la photoinhibition du PSII, la quantité et de la qualité des pigments photosynthétique ainsi que du couplage des antennes des photosystèmes. La majorité des résultats n'ont été obtenu que chez *S.alpina*.

Les feuilles de *Soldanella alpina* sous la neige ont un ratio Fv/Fm (c'est-à-dire le rendement quantique maximal) 10% plus faible que les feuilles dans les autres conditions ce qui indique une légère photoinhibition chez les feuilles sous la neige. Cette photoinhibition ne se retrouve pas chez les feuilles de *Geum montanum* pour qui le rendement quantique maximum reste équivalent quelques soit les conditions dans lesquelles se trouvent les feuilles.

Tableau 2: Mesure de la photoinhibition des feuilles de *Soldanella alpina* et de *Geum montanum* à différents stades de vie par le biais de la mesure du Fv/Fm

Fv/Fm	Feuilles sous la neige	Feuilles neuves	Feuilles vieilles
<i>Soldanella alpina</i>	0,72 ± 0,025	0,79 ± 0,006	0,81 ± 0,009
<i>Geum montanum</i>	0,78 ± 0,0064	0,79 ± 0,0069	0,79 ± 0,006

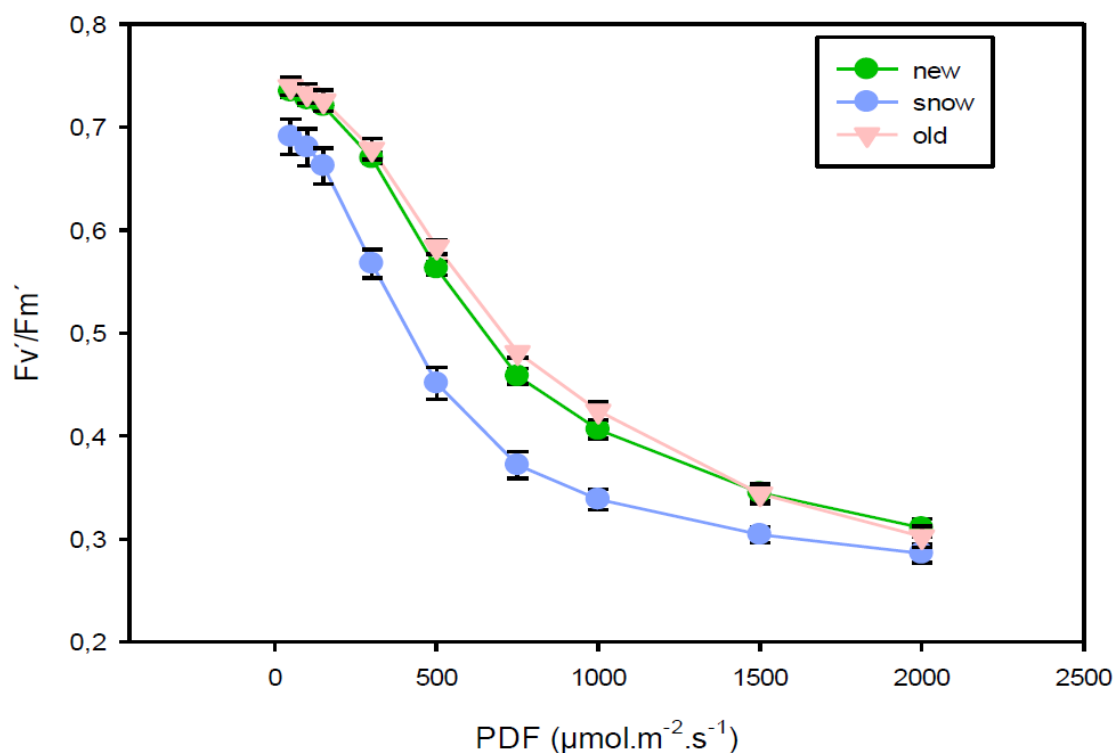


Figure 73: variation du F_v'/F_m' chez *Soldanella alpina* en fonction de l'intensité lumineuse à trois stade de vie de la plante à savoir les feuilles âgées (old), les feuilles jeunes (new) et les feuilles sous la neige (snow)

On constate sur la figure 73 que le rapport F_v'/F_m' , c'est-à-dire l'efficacité opérationnelle du photosystème II est beaucoup plus faible chez les feuilles de *Soldanella alpina* sous la neige. Ainsi on peut conclure qu'une moins grande portion de l'énergie absorbée est transférée en transport électronique chez les feuilles de neige en comparaison avec les autres conditions.

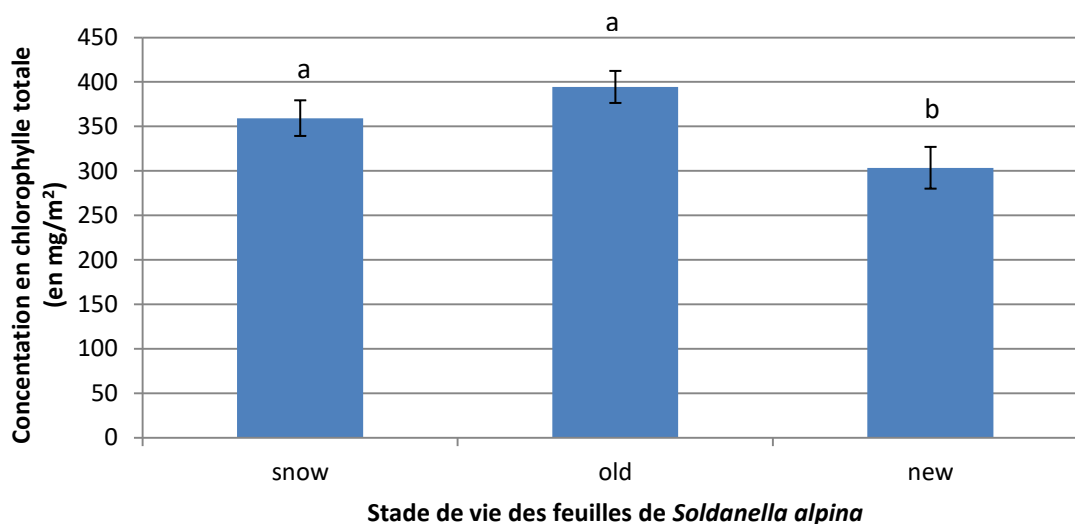


Figure 74: concentration de la chlorophylle totale mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur les campagnes de terrain juin-juillet 2018 et 2019 à différents stades de développement (n=22) à savoir pour les feuilles prélevées sous la neige (snow), les feuilles âgées (old) et les feuilles jeunes (new), ANOVA $p < 0,0001$

On constate que chez les plantes âgées, on a une quantité de chlorophylle plus importante en moyenne que dans les autres conditions chez *Soldanella alpina*. Les feuilles sous la neige en comparaison ont une quantité de chlorophylle totale légèrement plus faible. Ce n'est donc pas la quantité de chlorophylle qui peut expliquer le plus faible transport électronique total (Jt) des feuilles se trouvant sous la neige.

Il est intéressant de noter que c'est chez les feuilles jeunes que l'on retrouve la plus faible quantité de chlorophylle totale. Ainsi les jeunes feuilles en formation contiennent moins de chlorophylle que les feuilles à d'autres stades de vie. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les feuilles sont encore en formation. Cependant comme on a pu le voir sur les courbes d'assimilation en fonction de l'intensité lumineuse, cette quantité plus faible de chlorophylle totale ne corrèle pas avec les capacités photosynthétiques des jeunes feuilles et semble donc suffisante pour transporter suffisamment d'électrons pour assurer la photosynthèse.

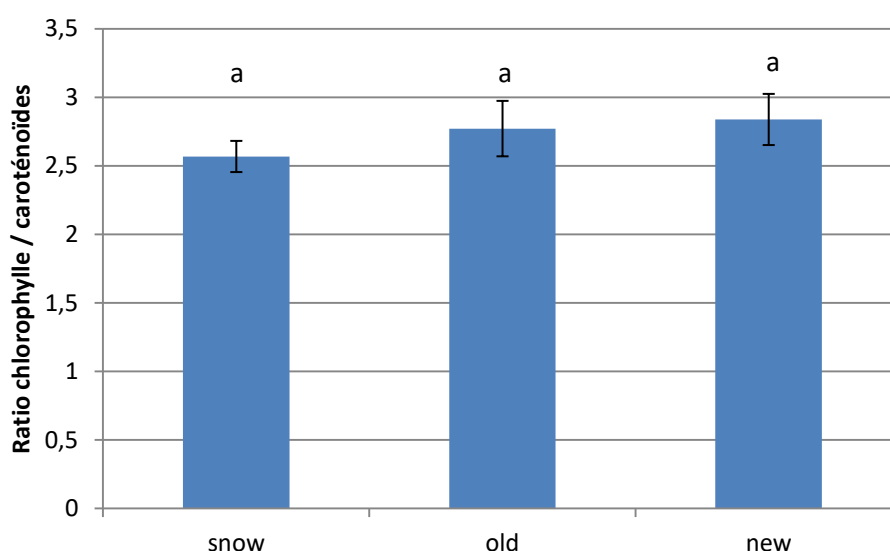


Figure 75: ratio chlorophylle totale / caroténoïdes mesuré dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur les campagnes de terrain juin-juillet 2018 et 2019 à différents stades de développement (n=22) à savoir pour les feuilles prélevées sous la neige (snow), les feuilles âgées (old) et les feuilles jeunes (new), ANOVA $p > 0,5$

La quantité de caroténoïdes est similaire dans toutes les conditions mais on peut regarder le ratio chlorophylle totale / caroténoïdes traditionnellement utilisé comme un indice de la photoprotection des feuilles. Chez *Soldanella alpina*, le ratio est très similaire à chacun des stades même si on remarque que les feuilles sous la neige semblent être les moins bien protégées. Les jeunes feuilles, au contraire, qui ont moins de chlorophylle que les autres mais autant de caroténoïdes semblent donc mieux protégées.

Pour ce qui est du ratio chlorophylle a/ chlorophylle b, on observe qu'il n'y a pas de différences entre les feuilles jeunes en cours de formation et les feuilles vieilles ayant résistées à l'enneigement pendant un hiver. En revanche, le ratio chlorophylle a/chlorophylle b est plus

faible pour les feuilles présentes sous la neige. Cette diminution du ratio pour les feuilles restant à basses températures et à l'obscurité pendant longtemps est donc le marqueur d'une augmentation de la quantité de chlorophylle b par rapport à la chlorophylle a.

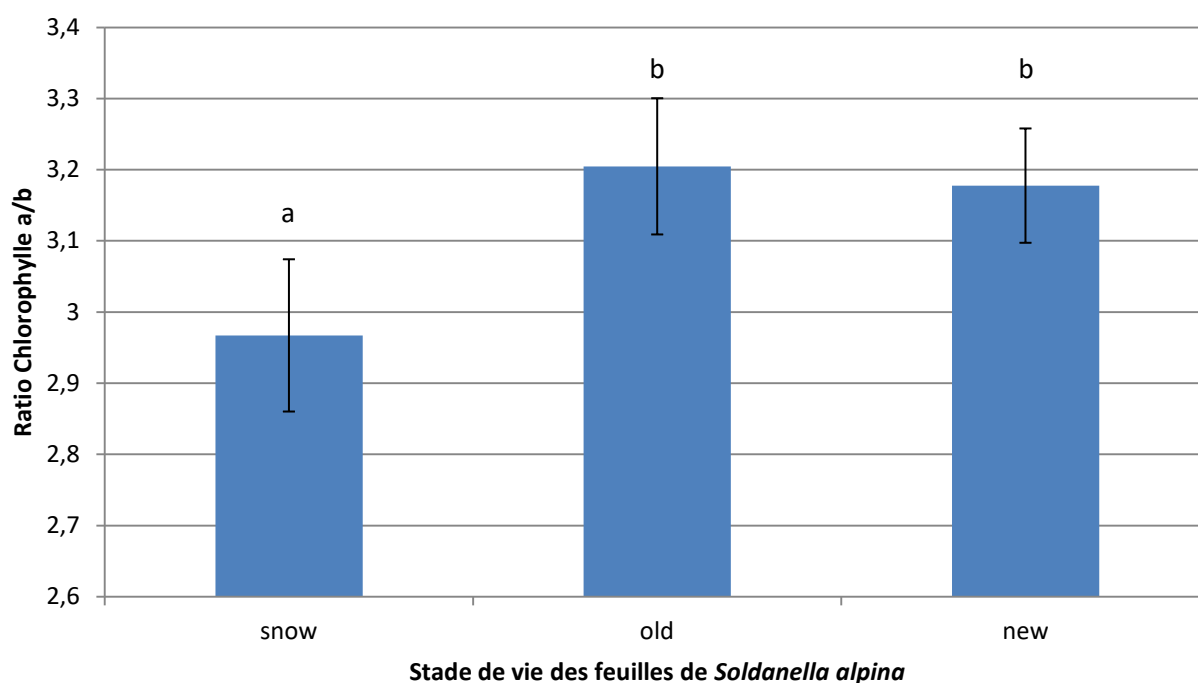


Figure 76: ratio chlorophylle a/chlorophylle b mesuré dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur les campagnes de terrain juin-juillet 2018 et 2019 à différents stades de développement (n=22) à savoir pour les feuilles prélevées sous la neige (snow), les feuilles âgées (old) et les feuilles jeunes (new), Kruskal-Wallis $p < 0,05$

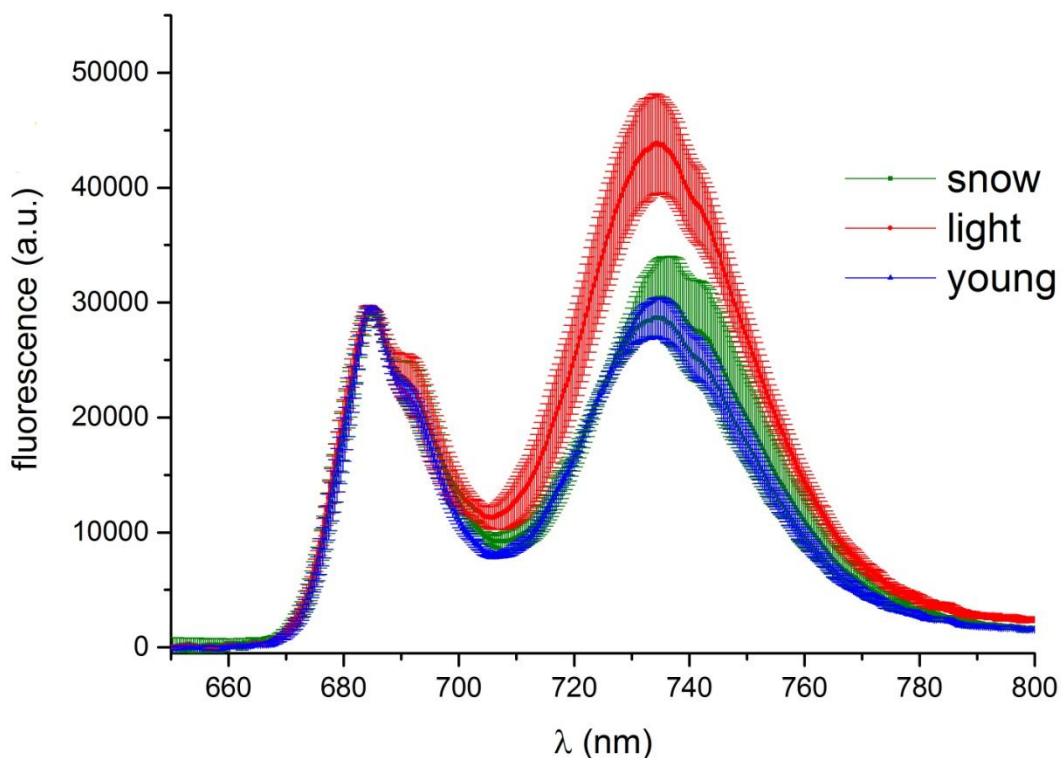


Figure 77: spectre de fluorescence chlorophyllienne à 77K des feuilles de *Soldanella alpina* sous la neige (snow, n=3), âgées (light, n=5) et jeune (young, n=3)

Les spectres de fluorescence chlorophyllienne à 77K ont été normalisés par les mesures obtenues au niveau du pic à 690nm qui correspond au PSII. On n'observe donc pas de différences au niveau du PSII sauf pour les unités CP43/CP47 du PSII. Les pics sont lisses à 690nm, il n'y a donc pas de découplage du PSII. Si le PSII était découplé, on observerait en effet un décrochage du pic à 680nm, longueur d'onde caractéristique des antennes LHCI. (Andrizhiyevskaya *et al.*, 2005)

Au niveau des pics à 735nm, on observe que la fluorescence est plus importante chez les plantes âgées que chez les plantes de neiges ou les plantes jeunes. Le pic à 735nm étant représentatif du PSI on peut dire que chez les plantes âgées une plus grosse portion de la lumière incidente est captée par le PSI par rapport aux autres conditions. On a la même tendance chez les feuilles sous la neige. Donc durant le développement la portion d'énergie transférée au PSI semble augmenter chez *Soldanella alpina*.

Il est possible que ceci soit indicatif d'un ratio PSI/PSII déséquilibré dans ses conditions contrairement à l'hypothèse posée par les calculs selon (Krall and Edwards, 1992) d'une répartition 50/50. Sous l'hypothèse que les capacités d'absorption soient similaires entre PSI et PSII, on aurait d'avantage un ratio de l'ordre de $2/5^{\text{ème}}$ pour les vieilles feuilles de *Soldanella alpina*.

On observe que le NPQ, que ce soit chez *Soldanella alpina* ou *Geum montanum*, augmente en fonction de l'intensité lumineuse.

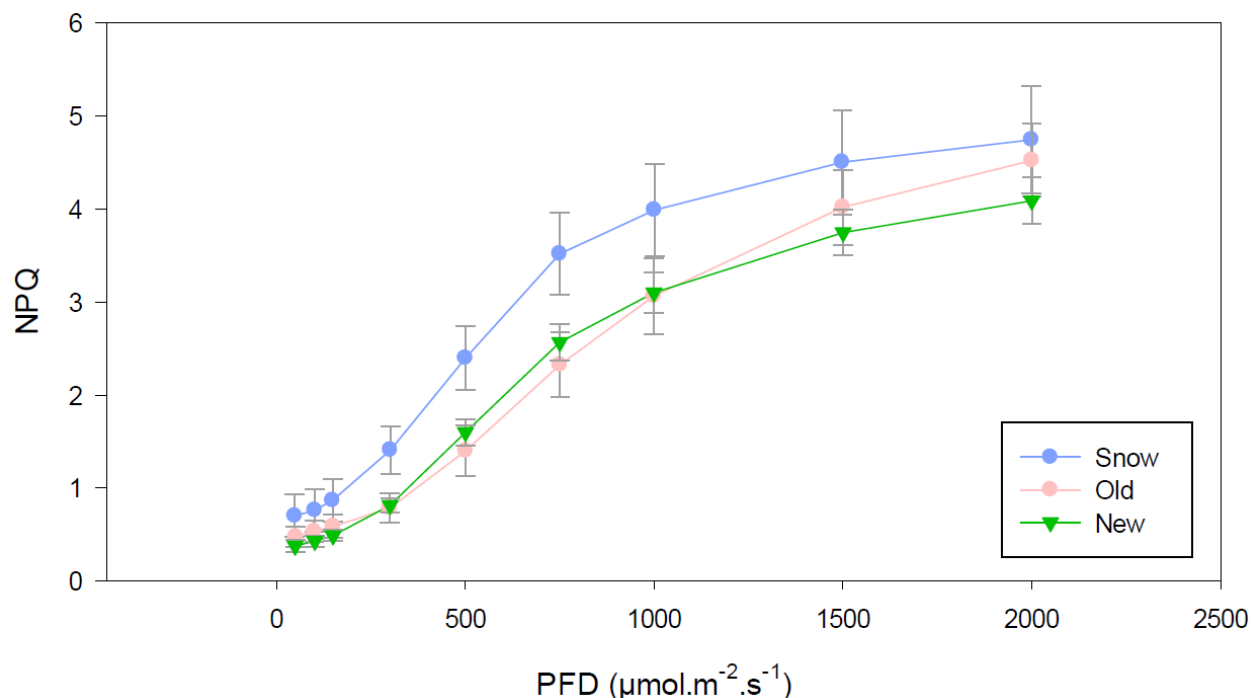


Figure 78: évolution du NPQ en fonction de l'intensité lumineuse chez les feuilles de *Geum montanum* jeune (new), âgées (old) ou prélevées sous la neige (snow)

Chez les deux plantes alpines *Geum montanum* et *Soldanella alpina*, on constate que le NPQ est globalement plus important chez les plantes prélevées sous la neige comparés aux plantes dont les feuilles sont jeunes et âgées. Chez *G. montanum*, cela est vrai quelle que soit l'intensité lumineuse. Chez *S. alpina* c'est surtout vrai à des intensités faibles : en effet, le NPQ n'est pas différent entre les différentes conditions à des intensités lumineuses moyennes et à fortes intensités lumineuses, le NPQ des feuilles sous la neige est plus faible en moyenne que celui des feuilles jeunes et âgées mais plus rapidement induit et le NPQ aux intensités lumineuses maximales est le plus fort chez les feuilles âgées.

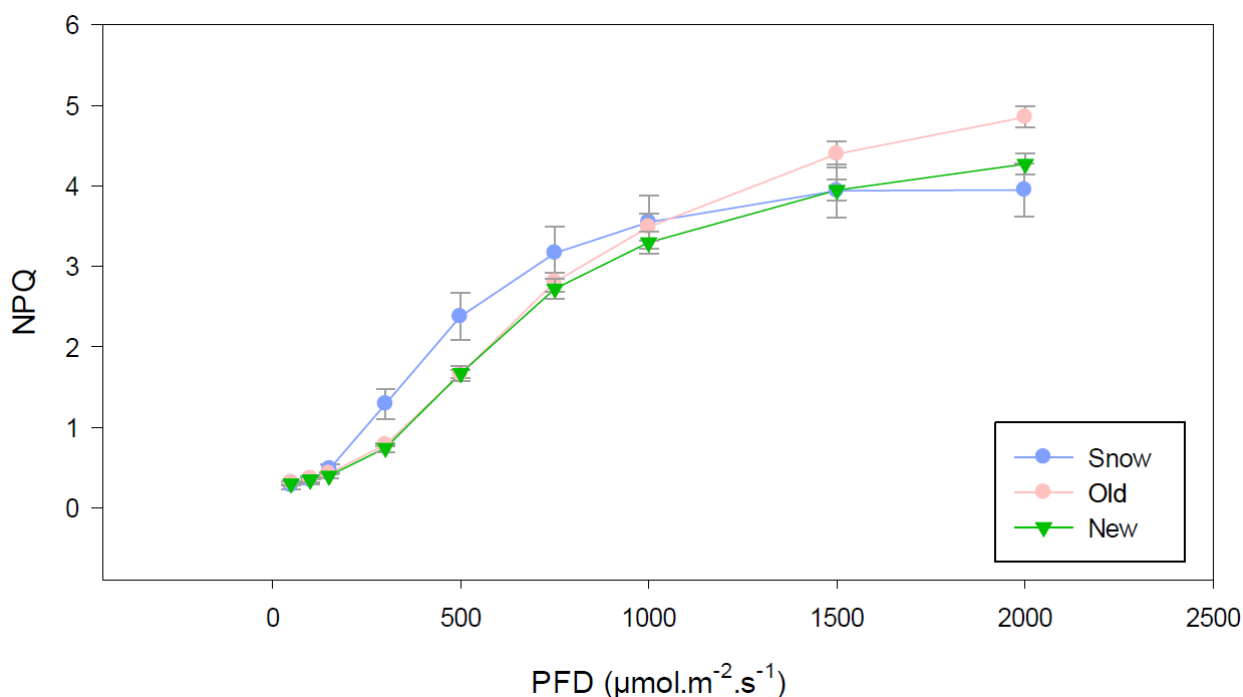


Figure 79: évolution du NPQ en fonction de l'intensité lumineuse chez les feuilles de *Soldanella alpina* jeune (new), âgées (old) ou prélevées sous la neige (snow)

Si la limitation du J_t chez les feuilles présentes sous la neige n'est pas seulement due à des processus ayant lieu en amont du PSII, est ce que ça pourrait être dû à des processus ayant lieu en aval du PSII?

Si la limitation du J_t ne se fait pas avant le PSII, peut être que la régulation se fait ensuite lors du transport des électrons du PSII au PSI puis au cycle de Calvin.

En étudiant l'état de réduction de la chaîne de transport des électrons et la rapidité de réoxydation de celle-ci, nous pourrions déterminer si la chaîne de transport est fortement engorgée où si on contraire les électrons y circulent sans contraintes.

Le q_L reflète l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques. Plus le q_L est proche de zéro et plus la chaîne de transport des électrons est réduite. C'est-à-dire que plus q_L est faible et plus il y a d'électrons qui restent au niveau des plastoquinones.

On constate que quelques soient les conditions, le q_L diminue en fonction de l'intensité lumineuse.

Chez *Geum montanum*, si à faible luminosité il n'y a pas de différences flagrantes, les différences augmentent à plus forte luminosité. Ainsi, à partir de $750 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on observe des différences importantes entre les q_L des différentes conditions : les feuilles

prélevées sous la neige présentent un état de réduction plus important que celui des feuilles jeunes et des feuilles âgées.

Chez *Soldanella alpina*, on retrouve le même constat : jusqu'à $500 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ il n'y a pas de différences importantes entre les différentes conditions examinées chez *Soldanella alpina*. On retrouve de même encore cette fois un état d'oxydoréduction plus important chez les feuilles prélevées sous la neige en comparaison des feuilles jeune ou des feuilles vieilles.

Pour les plantes alpines les feuilles présentes sous la neige semblent, au regard du qL, être les moins efficaces pour gérer le flux d'électrons. En revanche, plutôt que les feuilles nouvellement formées c'est les feuilles âgées qui sont les plus performantes pour maintenir une chaîne de transfert oxydée.

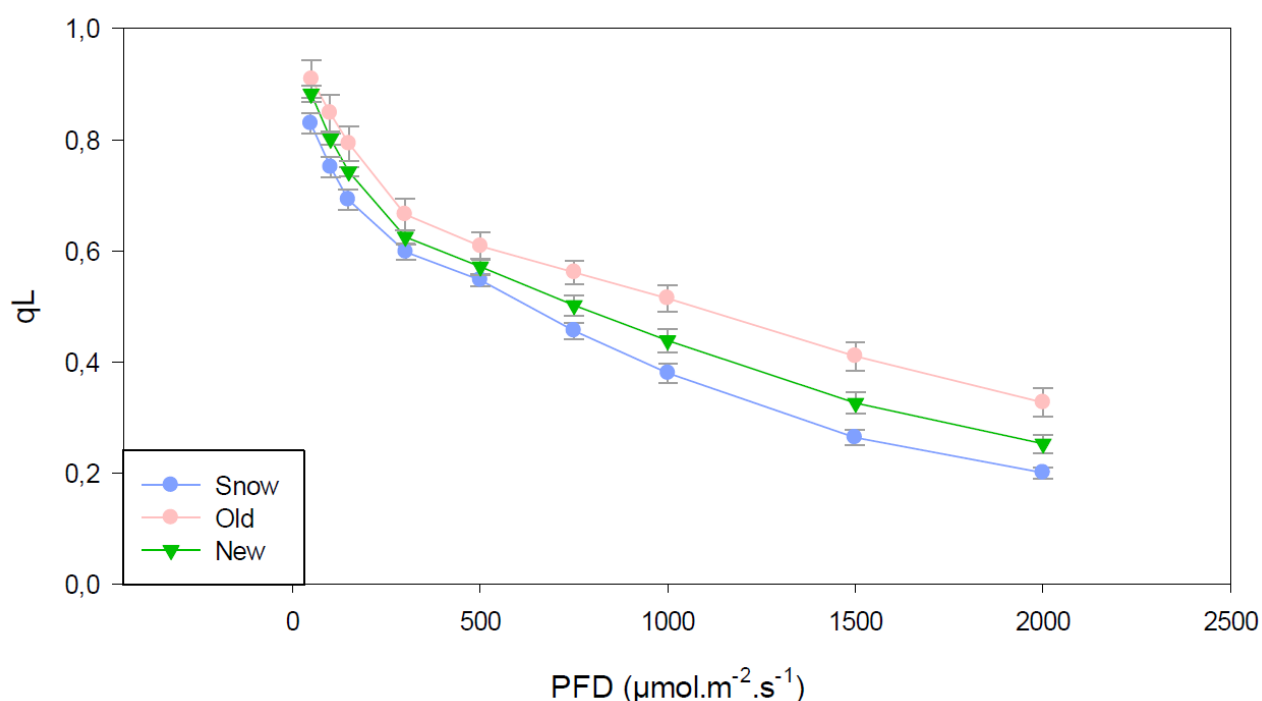


Figure 80: évolution du qL en fonction de l'intensité lumineuse chez les feuilles jeunes (new), âgées (old) et prélevées dans la neige (snow) de *Geum montanum*

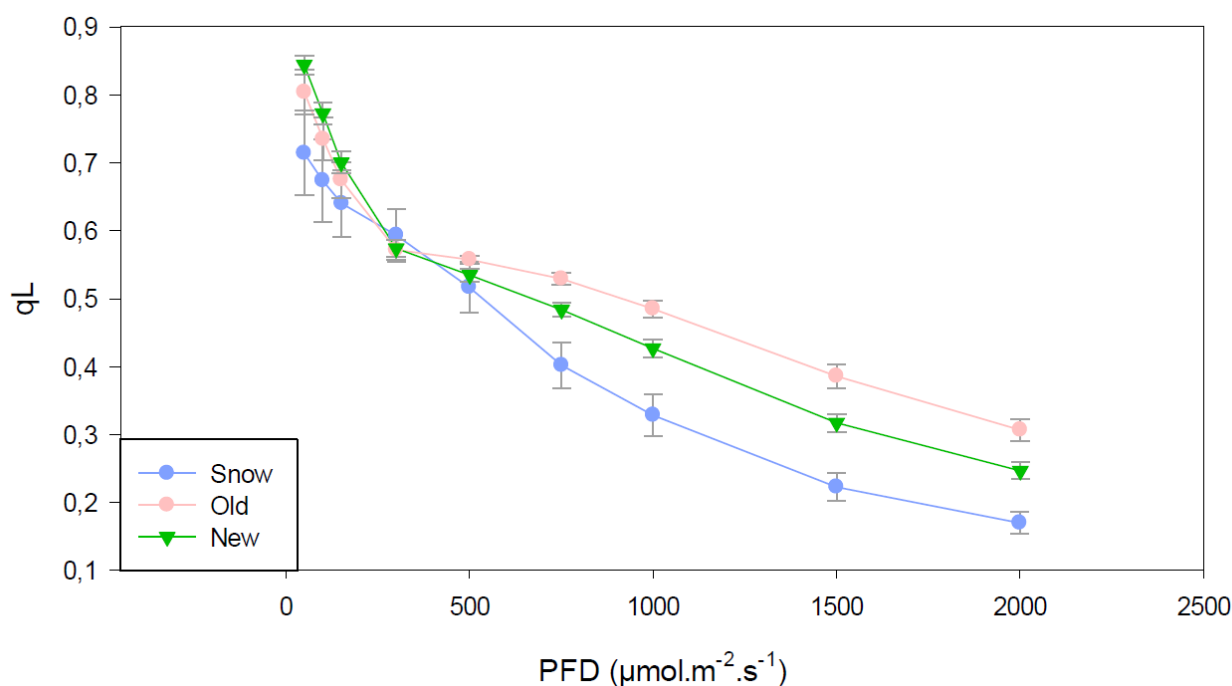


Figure 81: évolution du qL en fonction de l'intensité lumineuse chez les feuilles jeunes (new), âgées (old) et prélevées dans la neige (snow) de *Soldanella alpina*

Nous avons ensuite étudié la vitesse de réoxydation du pool de quinone. Cette dernière indique tout d'abord que *Geum montanum* a un pool de quinone plus réduit que ne l'ai celui de *Soldanella alpina* après deux flashes consécutifs.

Chez *Geum montanum*, la réduction du pool de quinone après deux flashes de lumière saturante consécutifs est plus marquée cependant, contrairement à *Soldanella alpina* les feuilles de *Geum*, quelques soient leurs conditions récupèrent l'intégralité de leur potentiel réducteur.

La réoxydation des quinones chez *Soldanella alpina* est très rapide chez les feuilles jeunes et les feuilles de neige. Chez les feuilles sous la neige, il y a une réoxydation rapide d'une partie du pool de quinone mais même en attendant 160 secondes entre les deux flashes de lumière saturante, le pool de quinone ne retrouve pas totalement son potentiel réducteur.

Contrairement à *Soldanella alpina*, on note également que c'est les plantes sous la neige qui sont les plus rapides à réoxyder leur pool de quinone. Les feuilles nouvellement formées et les feuilles âgées sortant d'une première période hivernale montrent une réoxydation du pool de quinone beaucoup plus lente. Au final, c'est d'ailleurs les feuilles âgées de *S.alpina* et les jeunes feuilles de *G.montanum* qui se réoxydent le plus lentement.

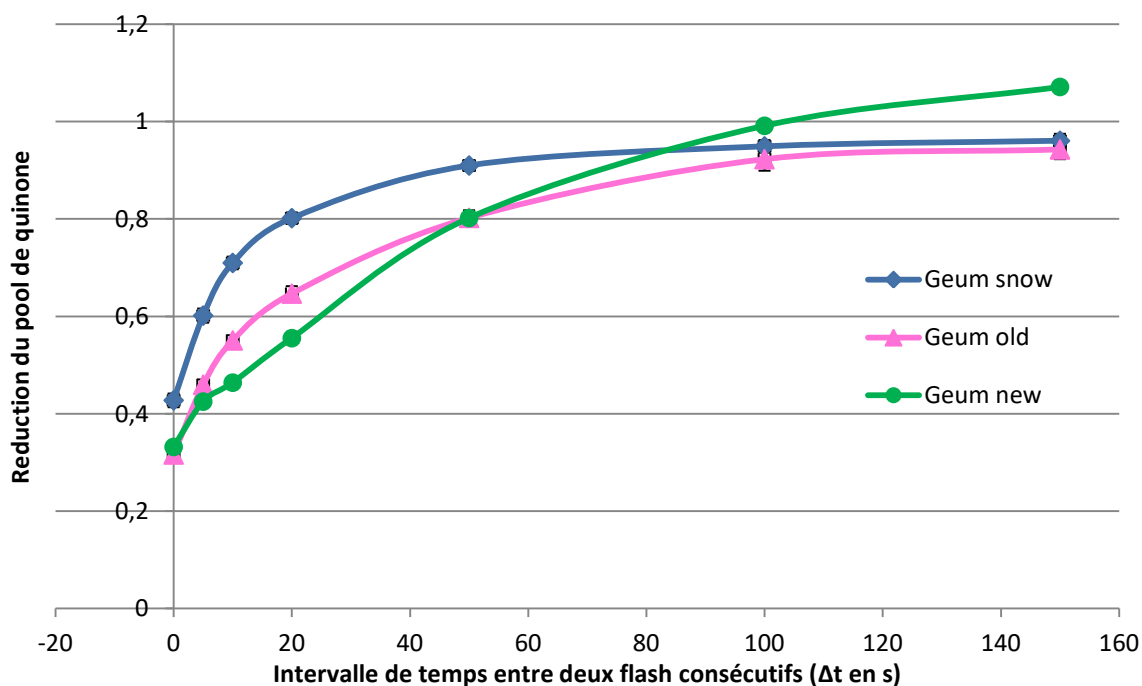


Figure 82: vitesse de réoxydation du pool de quinone chez les feuilles de *Geum montanum* à différents stades du cycle végétatif en fonction du temps entre l'exposition à deux flashes de lumière saturante consécutifs

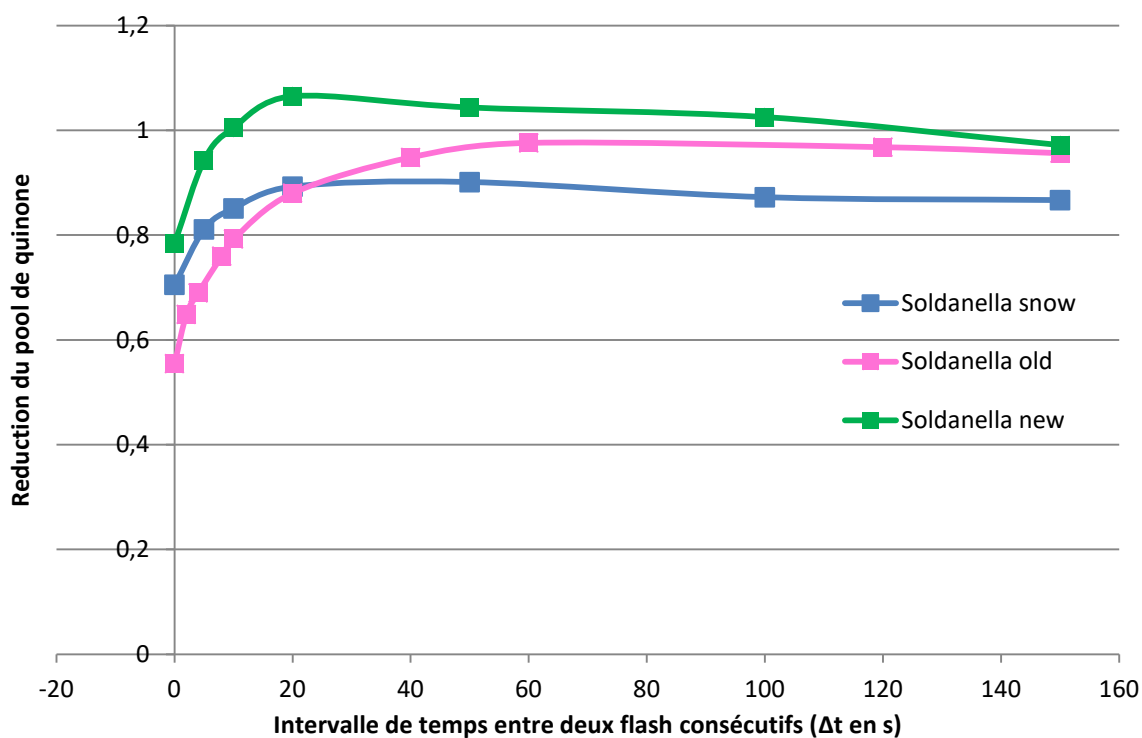


Figure 83: vitesse de réoxydation du pool de quinone chez les feuilles de *Soldanella alpina* à différents stades du cycle végétatif en fonction du temps entre l'exposition à deux flashes de lumière saturante consécutifs

Quels moyens de dissipation pour les électrons qui ne vont pas à la Rubisco ?

Comme on a pu le voir, on a un flux d'électrons non nul qui va vers des accepteurs autres que la Rubisco chez *Soldanella alpina* et *Geum montanum*. Ce flux est de l'ordre de 6 à 12 $\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. On peut se demander vers quels flux alternatifs se dirigent ces électrons. Il pourrait s'agir de la PTOX, de la malate deshydrogénase, du cycle de Mehler ou de la formation d'espèces réactives de l'oxygène. On peut donc s'attendre à ce que l'on ait, chez les feuilles présentant un transport en excès important, beaucoup d'enzymes et de métabolites participant à la détoxification des ROS. Pour cela, on a étudié le contenu en ascorbate et en quelques enzymes antioxydantes notamment l'ascorbate peroxydase (cytoplasmique et chloroplastique soluble), la catalase et la glutathion réductase chez *Soldanella alpina*.

L'activité de la Glutathion réductase est plus élevée chez les vieilles feuilles que dans les autres conditions. En revanche, si en moyenne il y a des différences entre les autres conditions elles ne sont pas marquées.

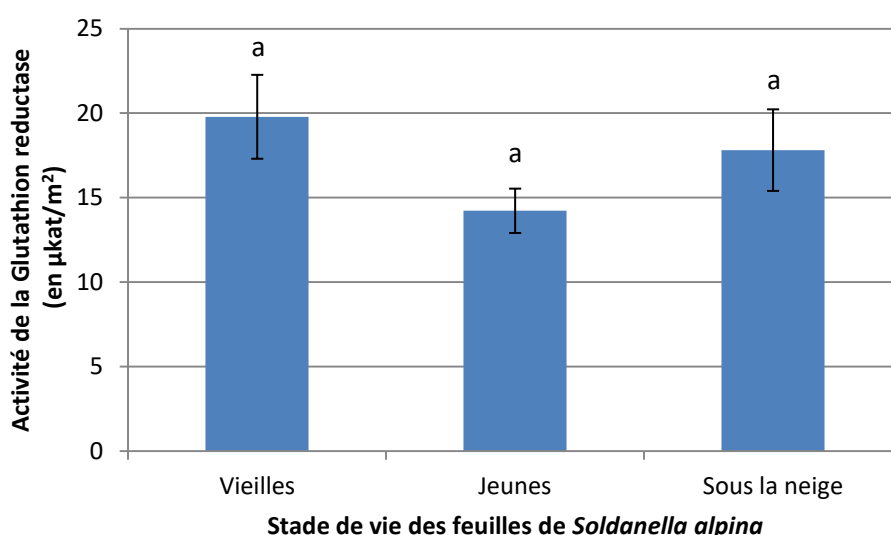


Figure 84: Activité de la Glutathion reductase mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=8), ANOVA $p > 0,1$

L'activité de l'ascorbate peroxydase cytoplasmique ne présente pas de différences importantes entre les différentes conditions. Elle est en moyenne relativement similaire dans les feuilles âgées, que celles-ci soient sous la neige ou non, et chez les feuilles jeunes.

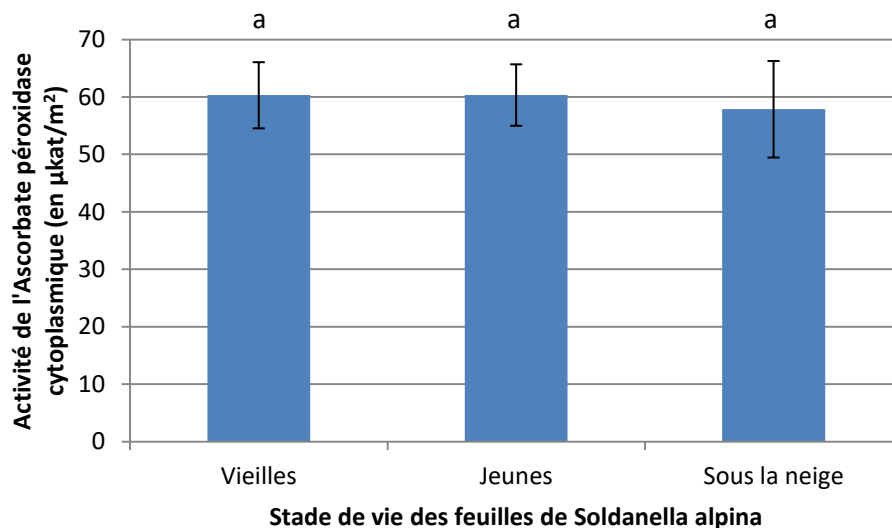


Figure 85: activité de l'ascorbate peroxydase cytoplasmique mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=7), ANOVA $p > 0,5$

Pour l'activité ascorbate peroxydase chloroplastique on a cette fois une différence marquée entre les différentes conditions étudiées. En l'occurrence, l'activité de l'ascorbate peroxydase chloroplastique est plus importante chez les jeunes feuilles que chez les vieilles feuilles.

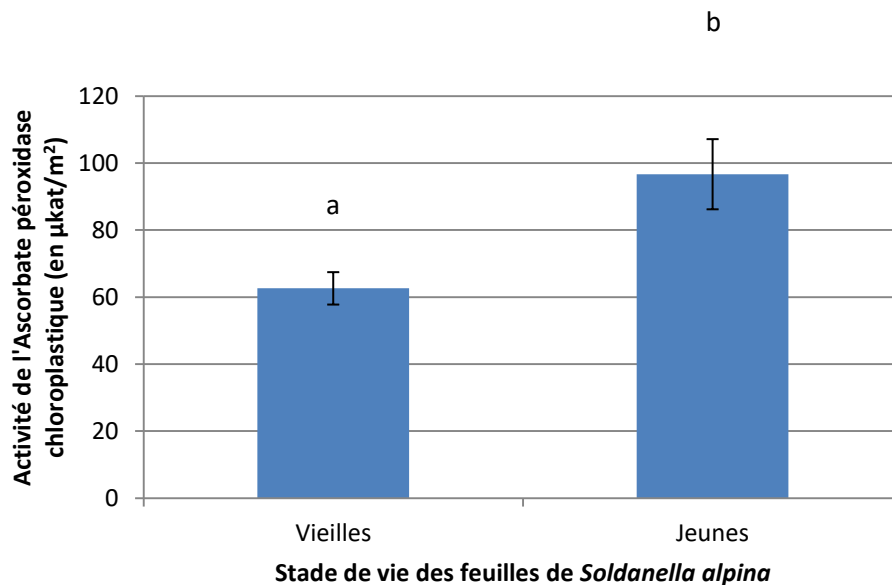


Figure 86: activité de l'ascorbate peroxydase chloroplastique soluble mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=4), test T $p < 0,001$

L'activité catalase est variable en fonction des conditions. On peut en effet trouver quelle est très forte chez les feuilles vieilles ou jeunes alors qu'elle est entre 40 à 60% plus faible chez les feuilles sous la neige.

L'activité catalase est la plus faible chez les feuilles des plantes encore sous la neige.

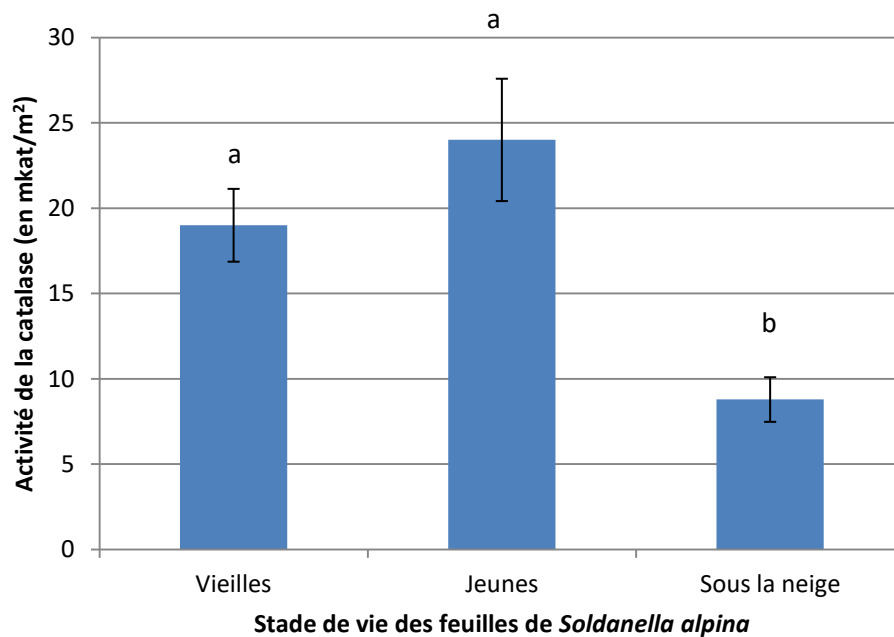


Figure 87: activité de la catalase mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=8), ANOVA $p < 0,01$

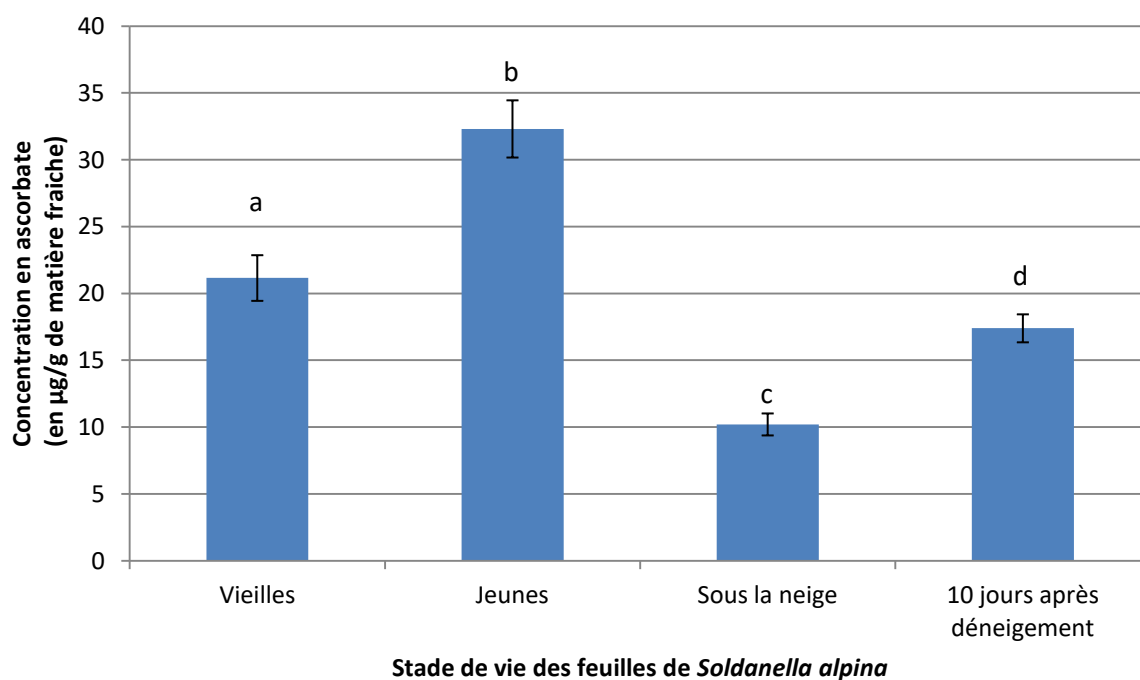


Figure 88: concentration en ascorbate mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=19), Kruskal-Wallis $p < 0,0001$

On constate que la concentration en ascorbate augmente au fur et à mesure de l'avancement du cycle de vie de *Soldanella alpina*. Ainsi, la concentration la plus importante se trouve chez les feuilles jeunes, tandis que chez les plantes qui sont sous la neige, les réserves d'ascorbate sont les plus faibles.

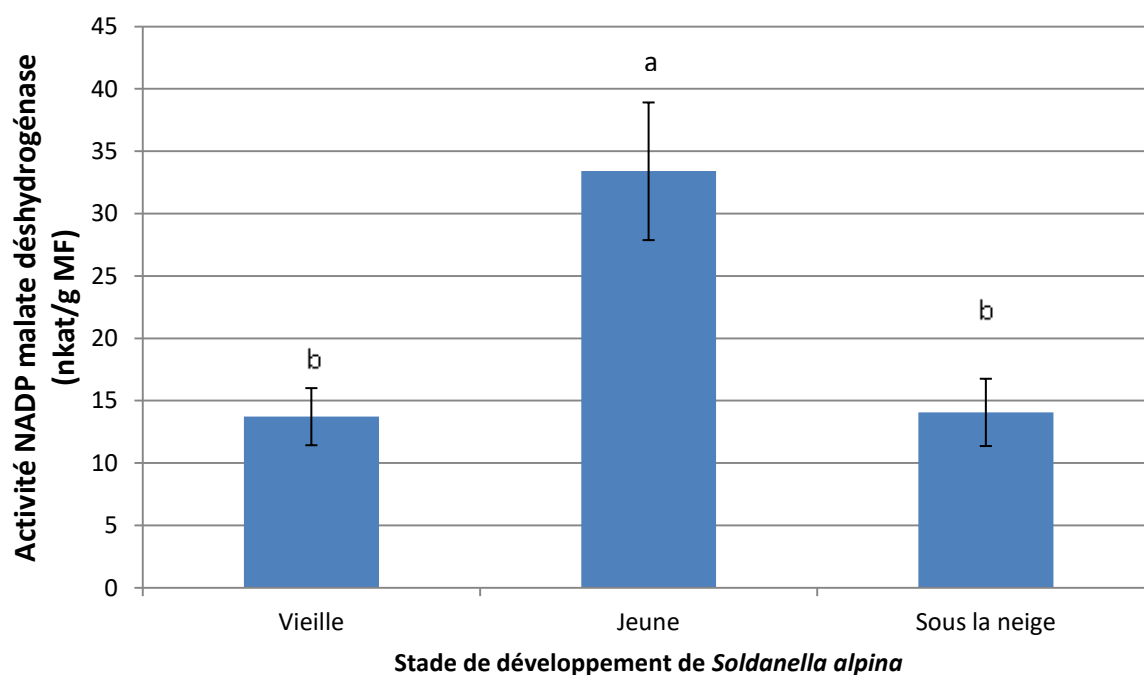


Figure 89: activité NADP-malate déshydrogénase (NADP-MDH) totale mesurée dans les feuilles de *Soldanella alpina* prélevées au Col du Galibier sur la campagne de terrain juin-juillet 2019 à différents stades de développement (n=4), ANOVA $p < 0,01$.

On a également étudié l'activité maximale (ou totale) de la NADP-malate déshydrogénase afin de savoir si la valve malate était potentiellement un flux alternatif en capacité de prendre en charge tout ou partie du flux électronique excédentaire chez *Soldanella alpina*. L'activité initiale de la NADP malate déshydrogénase n'a pas pu être mesurée du fait de contraintes techniques liées à l'étude sur le terrain. En effet, pour mesurer l'activité NADP-MDH initiale il faut congeler directement les échantillons sur le terrain ce qui, compte tenu de la nature escarpée du terrain, est difficilement réalisable. On constate que l'activité NADP-MDH est beaucoup plus forte chez les jeunes feuilles qu'elle ne l'est chez les feuilles sous la neige ou âgées. Les mesures ont été faites en fonction de la matière fraîche mais il est possible d'estimer l'activité par unité de surface en considérant que les feuilles de *Soldanella alpina* ont un ratio poids/surface compris entre 299,5 g/m² et 339,8 g/m² environ. Sachant que deux électrons sont nécessaires pour l'activité de la NADP-MDH on peut ensuite estimer le flux électronique allant à la NADP-MDH.

Tableau 3: Estimation du nombre d'électrons allant à l'activité maximale de la Malate déshydrogénase (MDH) chez *Soldanella alpina* à différents stades de son développement

Condition	Snow	Old	New
Estimation du nombre d'électrons allant à l'activité MDH (en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	9	8	22
Ratio poids/surface (g/m ²)	339,8	338,4	299,5

On constate que l'on a une activité MDH totale suffisante pour prendre en charge la totalité du flux électronique excédentaire mesuré chez les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* qui est au maximum d'environ $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Paramètre étudié	<i>Soldanella alpina</i>			<i>Geum montanum</i>		
	New	Old	Snow	New	Old	Snow
A_N max ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) mesuré à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	10,6 $\pm 0,32$	11,6 $\pm 0,38$	8,1 $\pm 0,3$	12,79 $\pm 0,75$	12,61 $\pm 0,76$	6,24 $\pm 0,51$
Intensité lumineuse saturante mesuré sur les courbes An/PFD à 400ppm ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	750	750	500	1000	1000	500
ETR_C ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	55,6 $\pm$ 2,4	61,7 $\pm 1,69$	34,0 $\pm$ 1,8	53,57 $\pm 3,27$	56,01 $\pm 3,22$	30,31 $\pm 1,99$
ETR_O ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	15,9 $\pm 0,78$	20,3 $\pm$ 0,48	8,3 $\pm$ 0,65	20,29 $\pm 1,29$	16,19 $\pm 1,11$	5,81 $\pm 0,42$
Transport vers autres accepteurs que la Rubisco ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	8,4 $\pm$ 1,06	9,4 $\pm$ 0,76	5,5 $\pm$ 1,24	7,74 $\pm 1,28$	11,88 $\pm 1,50$	11,56 $\pm 1,0$
NPQ à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	2,72 $\pm 0,126$	3,49 $\pm 0,17$	3,17 $\pm 0,32$	3,10 $\pm 0,22$	3,06 $\pm 0,41$	2,40 $\pm 0,34$
Chlorophylle (mg/m^2)	303,4 $\pm 23,4$	394,31 ± 18	359,24 ± 20	NR	NR	NR
Carotènes (mg/m^2)	141,3 $\pm 10,89$	131,83 $\pm 8,58$	144,38 $\pm 11,55$	NR	NR	NR
Ratio Chlorophylle a/b	3,18 $\pm 0,08$	3,2 $\pm 0,095$	2,96 $\pm 0,11$	NR	NR	NR
qL à 400 ppm de CO_2 à l'intensité lumineuse saturante.	0,48 $\pm 0,01$	0,49 $\pm 0,0126$	0,42 $\pm 0,018$	0,44 $\pm 0,02$	0,51 $\pm 0,024$	0,55 $\pm 0,01$
Ascorbate ($\mu\text{g/g}$ de MF)	32,31 $\pm 2,14$	21,16 $\pm 1,7$	10,21 $\pm 0,82$	NR	NR	NR
Glutathion réductase ($\mu\text{kat/m}^2$)	14,22 $\pm 1,3$	19,79 $\pm 2,5$	17,8 $\pm 2,14$	NR	NR	NR
Ascorbate peroxydase cytoplasmique ($\mu\text{kat/m}^2$)	60,35 $\pm 20,71$	60,31 $\pm 5,76$	57,88 $\pm 8,4$	NR	NR	NR
Ascorbate peroxydase chloroplastique ($\mu\text{kat/m}^2$)	96,67 $\pm 10,47$	62,6 $\pm 4,8$	NR	NR	NR	NR
Catalase (mkat/m^2)	24,0 $\pm 3,59$	19,0 $\pm 2,13$	8,79 $\pm 1,3$	NR	NR	NR

Discussion

Le modèle obtenu précédemment et éprouvé (chapitre 3) a été appliquée à deux plantes alpines *Soldanella alpina* et *Geum montanum*. Ces deux plantes ont un cycle de vie similaire, elles gardent leurs feuilles vertes pendant plus d'une année et se retrouvent donc entièrement sous la neige pendant la période hivernale. Lors de la fonte des neiges, les feuilles formées avant la période hivernale se retrouvent alors à affronter une variation brutale de température et de luminosité, passant en quelques jours de -10°C à 40°C tout en étant confrontées à une luminosité importante après avoir passé plusieurs mois à l'obscurité.

On a donc voulu savoir s'il était possible de trouver une raison physiologique au succès de ses deux plantes malgré la nécessité pour leurs feuilles de s'acclimater rapidement à des variations brusques qui se révèlent généralement mortelles. On a ainsi cherché à savoir si ces deux plantes étaient capables de réguler leurs transports électroniques, en réponse aux changements rapides des conditions environnementales subies au cours de leur vie, de manière à limiter le transfert des électrons à d'autres accepteurs que la Rubisco.

Un flux excédentaire non nul chez les plantes alpines.

Chez *Soldanella alpina* et *Geum montanum*, on a une photosynthèse plus faible chez les feuilles prélevées sous la neige en comparaison avec les feuilles jeunes et les feuilles âgées. Peu de différences sont observables entre les feuilles âgées et jeunes. Cette diminution de la photosynthèse chez les feuilles sous la neige n'est néanmoins pas liée à une diminution de la disponibilité en CO_2 dans la feuille. En effet, si on mesure l'assimilation de CO_2 en fonction de C_i , A_n reste beaucoup plus faible chez les feuilles sous la neige chez *Soldanella alpina* (données non montrés) et *Geum montanum* (figure n°67) même à de fortes pressions partielles en CO_2 .

En lien avec la diminution de la photosynthèse, on a également un J_v recalculé comme expliqué dans le chapitre n°3 avec une régression quadratique, plus faible chez les feuilles de *Geum montanum* et *Soldanella alpina* sous la neige. Ainsi, la photosynthèse plus faible pour les plantes sous la neige conduit à un plus faible flux électronique total.

Comme expliqué au chapitre n°3, pour recalculer les flux électroniques vers la carboxylation et l'oxygénation de la Rubisco on a besoin de mesurer la respiration à la lumière et le gamma star selon (Laisk, 1977). Dans la mesure où notre étude se veut la plus précise possible pour ce qui est des transports électroniques, on a donc décidé de mesurer ces deux paramètres pour chacune des plantes et dans chacune des conditions. Pour ce qui est du calcul du facteur de spécificité apparent, on retrouve des résultats cohérents avec ce

que l'on peut retrouver dans la littérature où on retrouve des facteurs de spécificité compris entre 150 et 65 pour plusieurs espèces (Galmes, Flexas et al. 2005). En revanche on peut également noter que nos valeurs, que ce soit pour la respiration à l'obscurité ou à la lumière, pour le gamma star, le facteur de spécificité ou l'équation de la régression, sont à chaque fois différentes d'une condition à une autre et d'une espèce à une autre.

On pourrait se demander si malgré toutes les précautions prises et expliquées au chapitre 3, cette variabilité ne serait pas la preuve de soucis de mesures ou du fait que les hypothèses que l'on a posé pour le g_m notamment ne sont pas trop grossière. En effet, on a fait l'hypothèse pour les mesures que le g_m était constant au cours de la mesure. Ainsi on a déterminé le gamma star en prenant en compte les courbes A/C_i et non A/C_c bien que l'estimation du gamma star soit ainsi moins bonne (Gong *et al.*, 2018). Du fait du calcul du facteur de spécificité apparent, les variations observées peuvent être dues seulement à une variation du gamma star ou également à une variation réelle du facteur de spécificité de la Rubisco en réponse aux variations environnementales.

Le gamma star, ou point de compensation du CO_2 , correspond à la quantité de CO_2 nécessaire pour que la photosynthèse et la respiration se compensent. Bien que ce paramètre de la photosynthèse soit d'avantage utilisé pour calculer le facteur de spécificité apparent de la Rubisco que discuté, il existe des cas d'acclimatation du gamma star en fonction de la température. Ainsi chez *Taraxacum officinalis* ayant poussé à différentes températures on observait un gamma star d'autant plus faible que la température à laquelle avait été acclimatée la plante était forte (Bunce, 2000). Cette variation du gamma star chez *T.officinalis*, également retrouvé par les mêmes auteurs chez le blé (Bunce, 1998), peut avoir plusieurs causes. Dans les articles les auteurs discutent notamment d'une variabilité de la diffusion du CO_2 dans la cellule du fait de la température ou encore d'un changement du taux de photorespiration de la plante pouvant permettre à la plante de limiter le stress oxydant à basses températures (Flexas *et al.*, 1999).

Si l'on se base sur les résultats obtenus pour *T.officinalis*, on s'attendrait donc à avoir pour les plantes prélevées sous la neige et étant restée à basses températures pendant longtemps, un gamma star fort. Ici ce n'est pas ce que l'on observe dans la mesure où au contraire les plantes sous la neige ont le gamma star le plus faible que ce soit chez *Soldanella alpina* ou chez *Geum montanum*. On a d'ailleurs une photorespiration faible dans cette condition ce qui va à l'encontre de l'hypothèse d'une acclimatation au froid via l'augmentation de la photosynthèse pour limiter le stress oxydant (Flexas *et al.*, 1999). Cependant, cette variation de gamma star observée pourrait simplement résulter du changement de configuration des membranes que l'on retrouve chez les plantes poussant à de basses températures. En effet, il est connu que la saturation des lipides membranaires augmente en réponse au froid. Cela a pour but de conserver la fluidité membranaire, nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, malgré la diminution des températures et le gel (Barrero-Sicilia *et al.*, 2017). Toutes les mesures étant faites à la même température, il se

peut que dans le cas des feuilles sous la neige acclimatées à des températures basses, les 25°C utilisés pour la mesure entraînent une augmentation de la fluidité membranaire plus importante chez les feuilles de neige que dans les autres conditions. La perméabilité membranaire serait alors plus élevée au CO₂ ce qui pourrait suffire à expliquer un gamma star plus bas.

Chez les feuilles jeunes et âgées, il est possible que les différences s'expliquent pour *Soldanella alpina* comme pour *Geum montanum* par une différence de diffusion du CO₂ dans la feuille.

En effet, on sait que les feuilles de *Soldanella alpina* sont relativement épaisses (Laureau *et al.*, 2015b; Talhouët *et al.*, 2019) et que cette épaisseur peut varier au cours de la vie de la plante en fonction des conditions dans lesquelles elles se trouvent : il est courant en effet d'observer une augmentation de l'épaisseur des feuilles en réponse à une acclimatation au froid (Boese and Huner, 1990) et il a été démontré que les feuilles de *Soldanella alpina* s'épaississent en réponse à des intensités lumineuses importantes (Talhouët *et al.*, 2019). Au vu du ratio poids/surface (tableau 3) plus important chez les plantes âgées que chez les plantes jeunes et de la littérature, il est raisonnable de penser que les feuilles âgées se sont épaissies pendant la période hivernale et sont donc plus épaisses que les feuilles jeunes. Cette épaisseur plus importante chez les feuilles âgées couplée à une augmentation de la résistance du mésophylle avec l'âge (Gong *et al.*, 2018) pourrait constituer une résistance à la diffusion du CO₂ et expliquer le plus fort gamma star chez les vieilles feuilles de *Soldanella alpina*.

Chez *Geum montanum*, la différence entre le gamma star des feuilles âgées et des feuilles jeunes est peu marquée ce qui semble indiquer qu'il n'y ait pas de différences majeures entre les deux conditions, d'autant plus que l'écart type pour cette donnée est important. De plus pour cette espèce, nous n'avons pas d'informations qui nous permettraient de mettre en lumière des différences anatomiques entre les feuilles vieilles et jeunes. Cependant, au contraire de *Soldanella alpina*, les vieilles feuilles de *Geum montanum* présentent une capacité photosynthétique plus forte que les jeunes feuilles. Cela pourrait suggérer une activité plus faible des enzymes du cycle de Calvin chez les jeunes feuilles de *G. montanum* par rapport aux vieilles feuilles. Si la limitation de l'assimilation est effectivement due à une activité enzymatique plus faible au niveau du cycle de Calvin-Benson, il est également possible d'imaginer qu'il en soit de même pour les aquaporines et l'anhydrase carbonique responsables de la diffusion du CO₂ dans la feuille. Ainsi la capacité de diffusion du CO₂ serait légèrement moins importante chez les jeunes feuilles par rapport aux vieilles feuilles et expliquerait donc le gamma star sensiblement plus faible que l'on observe chez les jeunes feuilles.

La respiration à la lumière est toujours inhibée par rapport à la respiration à l'obscurité (Villar *et al.*, 1994; Rafael *et al.*, 1995; Atkin *et al.*, 1997; Tcherkez *et al.*, 2017; Gong *et al.*,

2018). Cependant la mesure dans laquelle la respiration d'une plante est inhibée par la lumière varie grandement en fonction de l'âge, des conditions de croissance, des conditions de mesure et des espèces considérées. On peut ainsi trouver dans la littérature, une respiration à la lumière inhibée entre 16 et 81%. Les mesures d'inhibition de la respiration à la lumière chez *Geum montanum* se situent bien dans cette gamme de valeur. En revanche, chez *Soldanella alpina*, la respiration à la lumière est beaucoup moins inhibée de manière générale par rapport à ce qui est observé classiquement dans la littérature. Cependant, bien que ce ne soit pas la généralité, il existe d'autres espèces dont la respiration n'est pas ou peu inhibée par la lumière telle que montré par (Hurry *et al.*, 1996) avec l'étude du seigle. La respiration forte à la lumière chez *Soldanella alpina* peut alors être vue comme une adaptation aux conditions alpines. En effet la respiration foliaire à la lumière permet de limiter la photoinhibition de l'appareil photosynthétique et de prévenir la formation de ROS (Hurry *et al.*, 1996; Atkin *et al.*, 2000b) en utilisant les substrats excédentaires de la photosynthèse.

Quelques variations peuvent être notées entre les différents stades de vie des deux plantes. On a une inhibition de la respiration à la lumière, chez *Soldanella alpina* comme chez *Geum montanum*, qui est beaucoup moins marquée chez les feuilles âgées en comparaison avec les jeunes feuilles alors que c'est pourtant l'inverse que l'on s'attendait à observer d'après la littérature (Rafael *et al.*, 1995). De manière générale, il semble que le degré d'inhibition de la respiration à la lumière soit complètement insensible à des paramètres tels que la température (Atkin *et al.*, 1997; Atkin *et al.*, 2000a; Atkin *et al.*, 2000b; Atkin and Tjoelker, 2003) et que le degré d'inhibition varie d'avantage en fonction de la photosynthèse et de la respiration à l'obscurité. Les différences de métabolismes entre les 3 stades de vie étudiés pourraient donc suffire à expliquer la variabilité observée en terme d'inhibition de la respiration dans les différentes conditions de prélèvement.

Enfin, les corrélations entre ϕPSII et ϕCO_2 dans l'azote sont différentes à chaque fois également. En soit, ce n'est pas un souci important dans la mesure où ces corrélations servent surtout de courbes de calibration. Cependant, en prenant comme étalon le plus fort rendement du PSII dans l'azote, il est possible de calculer un rendement du CO_2 théorique dans l'azote et en déduire le nombre de photon nécessaire pour la fixation d'une molécule de CO_2 . On a ainsi besoin d'environ 8 photons pour les jeunes feuilles de *Soldanella alpina* ce qui est correct par rapport à ce que l'on retrouve dans des conditions optimales dans la littérature (Cornic and Baker, 2012). En revanche pour les feuilles sous la neige et les feuilles âgées, cela correspond d'avantage à 12 photons. Hors dans l'azote, l'oxygène ne peut être un accepteur donc il n'y a pas de flux alternatifs pouvant expliquer que l'on ai besoin d'un nombre plus important de photons pour la fixation d'une molécule de CO_2 . Cette différence entre l'optimum que l'on devrait observer et la réalité peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord par une plus grande répartition de l'énergie vers le PSI par rapport à la répartition 50/50 traditionnellement suggérée entre le PSII et le PSI. Les spectres de

fluorescence chlorophyllienne effectués à 77K vont dans ce sens dans la mesure où on observe un pic plus important correspondant à l'excitation du PSI en comparaison au pic correspondant à l'excitation du PSII chez les plantes sous la neige et les plantes âgées. Il se peut aussi que cela soit dû à la photoinhibition des plantes se trouvant sous la neige. Enfin, on pourrait arguer une plus faible efficacité du transfert d'énergie ou une différence d'absorption foliaire chez les feuilles âgées et sous la neige du fait d'un endurcissement au froid.

Le recalcul du flux excédentaire chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* montre qu'il existe chez ces plantes un flux électronique vers d'autres accepteurs que la Rubisco qui est non nul quelques soient les conditions dans lesquelles les plantes se trouvent. En revanche, si on regarde les valeurs, on peut constater globalement que s'il y a peu de différences entre les différentes conditions à des intensités lumineuses faibles, ce n'est pas le cas dès que l'on atteint des lumières saturantes. En effet, pour des intensités lumineuses saturantes on observe un flux électronique excédentaire légèrement plus faible chez les plantes sous la neige en comparaison avec les feuilles jeunes et les feuilles âgées.

Un transport excédentaire a déjà été montré chez une autre plante alpine *R.glacialis* (Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013) bien qu'il ne soit pas dans le même ordre de grandeur. En effet, chez *R.glacialis* le transport excédentaire calculé est compris entre 50 et 80 $\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alors que chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* on a au maximum 10 $\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cependant cette différence s'explique facilement par une différence dans la méthode et les corrections appliquées. En effet le recalcule de J_t pour *R.glacialis* a été fait selon (Cornic and Briantais, 1991) avec une régression linéaire pour la courbe de calibration entre ϕPSII et ϕCO_2 , puis les flux électroniques vers la carboxylation et l'oxygénation de la Rubisco ont été déterminés grâce au modèle de (Farquhar *et al.*, 1980). De plus, lors de la détermination du flux électronique excédentaire, (Laureau *et al.*, 2013) n'a pas divisé le flux électronique restant par 4 donc leur recalcul ne tiens pas compte du fait que le postulat de 4 électrons ne s'applique qu'à la photosynthèse et à la photorespiration et non aux voies alternatives.(Kramer and Evans, 2011)

Si on prends les résultats de (Laureau *et al.*, 2013) et que l'on divise par 4 le flux électronique excédentaire qui avait été trouvé chez *R.glacialis*, on aurait alors un flux excédentaire qui se rapprocherait d'avantage de 12 à 20 $\mu\text{mol d'électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. On aurait donc chez *Ranunculus glacialis* un flux électronique excédentaire plus fort que chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* mais globalement dans le même ordre de grandeur.

Chez *Ranunculus glacialis* (Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013) le flux électronique excédentaire est pris en charge par la protéine PTOX qui était présente en grande quantité chez cette plante et permettait une réoxydation rapide du pool de quinone. Chez *Geum montanum* comme *Soldanella alpina*, quel que soit le stade de vie considéré, nous n'avons pas été capables de montrer une différence de la quantité de PTOX (Talhouët : résultats

préliminaires), comme ce qui a pu être montré chez les feuilles d'ombre et de lumière de *R.glacialis* (Laureau *et al.*, 2013), qui aurait pu être corrélé au flux excédentaire. Il reste néanmoins la possibilité que d'autres accepteurs soient impliqués chez *Geum montanum* et *Soldanella alpina* pour consommer ces électrons en excès.

Pourquoi a-t-on un transport électronique plus faible chez les plantes sous la neige ?

On pourrait penser que le transport électronique plus faible chez les plantes sous la neige n'est pas suffisant pour supporter l'activité de la Rubisco mais comme on l'a vu plus tôt, il y a des électrons en excès dans cette condition chez *G.montanum* comme chez *S.alpina*. Il y a donc un flux électronique largement suffisant et même excédentaire en particulier pour les plantes sous la neige comme en général dans les autres conditions. Donc le transport électronique au niveau du PSII ne limite pas l'assimilation du CO₂ quelques soient les conditions étudiées. Néanmoins, le transport électronique vers le PSII reste beaucoup plus faible chez les feuilles de neiges que dans les autres conditions et on peut donc se demander comment les feuilles sous la neige régulent leur transport électronique.

Tout d'abord, on peut voir que les feuilles sous la neige sont légèrement photoinhibées (tableau 2 et figure 73) bien que le rendement de la photosynthèse sous la lumière soit suffisant pour supporter un plus fort transport électronique.

La concentration en chlorophylle (figure 74) reste plus forte chez les feuilles de neige de *Soldanella alpina* par rapport aux jeunes feuilles. Par conséquent l'absorption de la lumière pour supporter la photosynthèse ne limite pas le transport électronique chez les feuilles de neige.

D'ordinaire chez les plantes soumises à des températures faibles, on a une diminution de la quantité totale de chlorophylle ce qui peut alors expliquer une plus faible absorption de la lumière et ainsi une plus faible assimilation du CO₂ par le biais de la photosynthèse (Kudoh and Sonoike, 2002; Zhang and Scheller, 2004; Kaur *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2012; Javanmardi *et al.*, 2013). Ici au contraire on n'a pas de différences importantes entre les plantes sous la neige et les feuilles âgées. Les feuilles sous la neige ont une quantité de chlorophylle seulement 8% plus faible en comparaisons aux feuilles âgées ce que laisse à penser que la chlorophylle est chez *Soldanella alpina* bien protégée contre la dégradation à faible température et faible luminosité. Chez *A.thaliana*, la diminution de la quantité de chlorophylle en réponse des températures de 4°C était de 11% (Zhang and Scheller, 2004). En ce sens *Soldanella alpina* est bien plus résistante et la diminution faible de la quantité de la quantité de chlorophylle ne semble pas expliquer à elle seule la diminution du flux électronique total. D'autant plus que si on regarde la quantité de chlorophylle totale, on remarque que chez les

jeunes feuilles, on a une quantité de chlorophylle plus faible que chez les feuilles âgées et sous la neige sans que l'on ait pour autant une assimilation plus faible.

La quantité de caroténoïdes est similaire pour chaque stade de la vie de *Soldanella alpina*. Donc il semble que la concentration en caroténoïdes ne pourrait donc pas non plus provoquer une diminution de l'absorption de la lumière chez les feuilles de neige. Les caroténoïdes étant des pigments dont le rôle antioxydant et photo-protecteur est bien documenté (Young, 1991) c'est peut être ça qui explique que l'on n'ait pas une diminution de la quantité de chlorophylle totale malgré le froid et l'obscurité dans les feuilles de *Soldanella alpina* sous la neige. Les jeunes feuilles du fait d'un ratio chlorophylle totale/caroténoïdes plus grand sont plus protégées que les feuilles des autres conditions. Par ailleurs les données pour les caroténoïdes sont cohérentes avec ce qui est obtenue chez (Bidel *et al.*) chez les feuilles de *Soldanella alpina* ayant poussé à l'ombre et à la lumière.

En revanche, si l'on ne note pas de grandes différences au niveau de la concentration totale en chlorophylle, on observe que chez les feuilles sous la neige, le ratio chlorophylle a/b est beaucoup plus faible que dans les autres conditions. Cette réduction du ratio chlorophylle a/chlorophylle b est également observée par (Kudoh and Sonoike, 2002) chez le concombre et était imputée à la destruction des PSI qui ont un ratio chlorophylle a/b très important. Le PSI est en effet très sensible aux basses températures et tends à être fortement dégradé en réponse à ce type de stress (Kudoh and Sonoike, 2002; Zhang and Scheller, 2004). Ici, les données des spectres de fluorescence chlorophyllienne à 77K qui montrent chez les feuilles sous la neige une répartition de l'énergie reçue légèrement plus importante vers le PSI par rapport aux jeunes feuilles ne semblent pas aller dans ce sens. Un ratio chlorophylle a/b plus faible pourrait aussi nous amener à penser que les feuilles sous la neige possèdent de plus larges antennes au niveau des PSI et PSII (donc moins de centres réactionnels et plus d'antennes) afin de permettre à la plante dans cette condition de mieux capter la faible lumière qui peut traverser le manteau neigeux sous lequel elles se trouvent.

Nous avons également regardé, pour tenter d'expliquer la diminution du transport électronique total, des spectres de fluorescence chlorophyllienne fait à 77 K pour savoir si les antennes du photosystème II étaient couplées ou non. En effet, on pensait pouvoir expliquer la diminution de la photosynthèse chez les plantes présentes sous la neige par un découplage des antennes, notamment au niveau du PSII. Les spectres obtenus via l'étude de la fluorescence chlorophyllienne à 77k montrent que l'on n'a pas de découplage des antennes pour le PSII. Ce n'est donc pas l'état des antennes qui explique la diminution du flux électronique total chez les feuilles sous la neige. On n'observe pas non plus une différence de ratio entre PSI et PSII entre les jeunes feuilles et les feuilles sous la neige, ce qui tend à aller à l'encontre de l'hypothèse posée plus tôt d'une destruction du PSI chez les plantes de *Soldanella alpina* sous la neige (Kudoh and Sonoike, 2002). En revanche chez les feuilles de *S.alpina* âgées, on observe une distribution inégale de la lumière entre le PSII et le PSI. En effet, chez les plantes âgées, on a plus de PSI que de PSII. Il semble donc que l'on ait une

synthèse de PSI au cours de la fonte des neiges puis chez les plantes âgées au point de changer la répartition de l'énergie du PSII vers le PSI au fur et à mesure de la vie de la plante.

Cette répartition inégale de l'énergie entre le PSII et le PSI pourrait indiquer un transport cyclique important. Cette stratégie est connue chez *Geum montanum* (Manuel *et al.*, 1999; Streb and Cornic, 2011) mais pas répertoriée chez *Soldanella alpina*. Dans ce cas, comme le flux cyclique au niveau du photosystème I permet de renforcer le différentiel de pH entre le lumen et le stroma, on s'attend à ce que dans ses deux conditions on ait une dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Le NPQ est plus rapide mais pas nécessairement plus fort chez les feuilles sous la neige de *Soldanella alpina*. En revanche, le NPQ est effectivement plus important globalement chez les feuilles âgées de *Soldanella alpina* donc on a peut être dans ces conditions un flux cyclique plus important autour du PSI.

Le Licor prend pour hypothèse un ratio PSII/PSI de 0,5 par défaut. Chez les plantes dont les feuilles sont jeunes ou sous la neige, on a une répartition homogène de l'énergie entre les deux photosystèmes donc il ne paraît pas aberrant de penser que l'on ait un ratio PSII/PSI également équilibré. Mais pour les plantes âgées, il semble donc que cette hypothèse soient potentiellement inadaptée ce qui pourrait donc être un point discutable de l'application de notre méthode à *Soldanella alpina* dans cette condition.

Bien que les antennes ne soit pas découplé, l'étude du F_v'/F_m' permet d'avoir une information sur l'efficacité du transport des électrons des antennes aux centres réactionnels du PSII. Le F_v'/F_m' est plus faible chez les feuilles de *Soldanella alpina* sous la neige part rapport à ce que l'on observe chez les feuilles âgées ou jeunes. Cela signifie que l'efficacité du transfert des électrons des antennes aux centres réactionnels est plus faible pour les feuilles sous la neige de *Soldanella alpina*.

Finalement, nous nous sommes intéressés à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur par le biais de l'étude du NPQ. On a un NPQ plus fort chez les plantes sous la neige chez *Geum montanum*. Le transport cyclique est une des stratégies d'acclimatation connue de *G. montanum* au climat alpin (Manuel *et al.*, 1999; Streb and Cornic, 2011) et dans la mesure où le transport cyclique permet de renforcer le ΔpH dans le chloroplaste et ainsi favoriser la dissipation d'énergie sous forme de chaleur il n'est pas incohérent de voir que pour les feuilles sous la neige le NPQ soit plus important. On constate que s'il y a effectivement un NPQ plus important chez les feuilles sous la neige chez *G. montanum*, ce constat est plus nuancé chez *Soldanella alpina*. En effet, chez *S. alpina* on a un NPQ légèrement plus élevé chez les feuilles sous la neige mais seulement à des intensités lumineuses faibles, le maximum n'est pas différent de ce qui est observé chez les jeunes feuilles donc le NPQ est plus rapide mais pas plus fort. Comme vu plus haut, le NPQ est en revanche plus fort au niveau des feuilles âgées ce qui serait peut être synonyme d'un transport cyclique plus important et d'une meilleure efficacité du transfert d'énergie sous la lumière.

Est-ce que le transport en excès est corrélé avec les moyens de dissipation des électrons autre que la photosynthèse et la photorespiration?

(Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013) avaient déjà mis en évidence un flux électronique excédentaire important chez une autre plante alpine similaire à *Soldanella alpina* et *Geum montanum*. Comme elles, *Ranunculus glacialis* pousse à des altitudes supérieures à 2400m et est confrontée à des contraintes et des stress similaires (Laureau *et al.*, 2011).

Un des mécanismes explicatifs avancé par (Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013) était la présence de la protéine PTOX. Généralement plus exprimé chez les plantes au stade adulte dans la mesure où elle est d'avantage utile en début de développement foliaire (Carol *et al.*, 1999; Carol and Kuntz, 2001), des western blots mettaient en avant le fait que cette protéine était abondante chez *Ranunculus glacialis* (Laureau *et al.*, 2013). Des mesures faites par (Trouillard *et al.*, 2012) avaient montré également qu'il y avait une vitesse de réoxydation plus rapide du pool de quinone chez *Ranunculus glacialis*. Cette vitesse de réoxydation du pool de quinone, directement corrélé PTOX (Trouillard *et al.*, 2012), avait été prise comme mesure de l'activité PTOX et semblait suggérer non seulement une présence importante de la protéine PTOX mais également une activité forte de celle-ci en l'absence d'autres accepteurs disponibles. Pour compenser un système antioxydant particulièrement faible, il avait alors été conclu que la PTOX agissait chez la Renoncule des glaciers comme une « valve de sécurité » (Laureau *et al.*, 2013).

Pour *Soldanella alpina* comme pour *Geum montanum*, nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats concernant la quantité de protéine PTOX donc nous ne pourrions pas conclure par rapport au rôle de PTOX aux différents stades de vie des feuilles. Nous savons néanmoins que les feuilles de *Geum montanum* contiennent de la PTOX même une fois leur développement terminé et que la quantité de PTOX chez cette espèce était directement liée à l'altitude à laquelle poussait *G. montanum* (Manuel *et al.*, 1999; Streb *et al.*, 2005; Streb and Cornic, 2011). Chez *Soldanella alpina* on a également de la PTOX chez les feuilles jeunes comme chez celles ayant fini leur développement (données non publiées). On a donc regardé l'état d'oxydation de la chaîne de transport des électrons ainsi que la rapidité de réoxydation du pool de quinone. Chez *G. montanum* comme *S. alpina*, c'est les feuilles sous la neige qui présentent une chaîne de transport des électrons la plus réduite bien que la rapidité de réoxydation du pool de quinone soit relativement rapide (d'avantage chez *Geum montanum* que chez *Soldanella alpina*). Cette rapidité de réoxydation du pool de quinone pourrait s'expliquer par l'intervention de flux alternatifs tel que la PTOX dans un contexte où les feuilles sous la neige sont fortement stressées (Feilke *et al.*, 2016) du fait des faibles températures et du manque de lumière. Cette rapidité de réoxydation du pool de quinone pourrait aussi être le fait d'autres voies alternatives telles que la réaction de Mehler, la valve malate, ...dont l'implication chez *G. montanum* n'a jamais été étudiée du fait de difficultés à mesurer des activités enzymatiques chez cette plante.

Les feuilles âgées au contraire sont les plus efficaces à priori pour garder le PSII oxydé dans la mesure où elles ont une chaîne de transport bien moins réduite que ce que l'on observe pour les autres stades de vie. Chez *Soldanella alpina* c'est les flux plus importants vers la photosynthèse et la photorespiration, pour *Geum montanum*, il faut un autre accepteur. La vitesse de réoxydation dans cette condition n'est pas plus importante et ne semble pas indiquer non plus d'action de PTOX pour prendre en charge une partie des électrons excédentaires bien que le déséquilibre entre PSI/PSII et les récents résultats concernant le rôle potentiel de la PTOX chez les feuilles sénescentes ait pu suggérer le contraire (Tallón and Quiles, 2007; Krieger-Liszkay *et al.*, 2019).

Chez *Soldanella alpina*, on n'a pas pu mettre en évidence une variation de la quantité de PTOX en fonction des conditions environnementales. En revanche, un des mécanismes d'acclimatation connu de *Soldanella alpina* au climat alpin réside dans la très forte capacité de cette plante à détoxifier les ROS. Sa survie passe majoritairement par le contrôle des ROS (Streb and Cornic, 2011). On a donc regardé ici les variations des activités de plusieurs enzymes et composés antioxydants pour voir si les électrons excédentaires chez *Soldanella alpina* pouvaient en effet être en partie pris en charge par les systèmes de détoxification des ROS.

On a dans les feuilles de *Soldanella alpina* de l'ascorbate en très grande quantité. La quantité d'ascorbate augmente après la sortie des feuilles de la neige. Donc la quantité d'ascorbate dépend probablement de la présence ou non de lumière. Cependant c'est chez les jeunes feuilles que l'on trouve le plus d'ascorbate. Ainsi l'ascorbate serait synthétisé en grande quantité chez les jeunes feuilles puis diminuerait une fois les feuilles sous la neige (probablement pour détoxifier les ROS pendant l'hiver et préserver l'appareil photosynthétique des feuilles sous la neige) et après la fonte des neiges, l'ascorbate serait de nouveau synthétisé. Cela suggère que la forte concentration en ascorbate joue son rôle antioxydant par rapport à la lumière.

La concentration en ascorbate n'est toutefois pas corrélée avec l'activité ascorbate peroxydase. En effet, l'activité de l'ascorbate peroxydase cytoplasmique ne varie pas chez *Soldanella alpina* entre les différents stades de vie. Au contraire, c'est les jeunes feuilles qui possèdent une activité ascorbate peroxydase chloroplastique la plus importante. Cette activité dans les chloroplastes des jeunes feuilles pourrait indiquer une formation de ROS plus importante.

L'activité de la glutathion reductase, une autre enzyme du cycle ascorbate-glutathion est par contre la plus faible chez les jeunes feuilles. Hors le glutathion réduit participe à la photoprotection de *Soldanella alpina* en facilitant la réparation du PSII après inactivation de celui-ci dans des températures importantes (Laureau *et al.*, 2011). On peut supposer que du fait de la forte concentration en ascorbate dans les jeunes feuilles, le pool d'ascorbate n'a pas besoin d'être régénéré aussi rapidement par le biais de cette voie métabolique que le pool

d'ascorbate moins conséquent des feuilles vieilles ou des feuilles sous la neige. Il a été montré qu'une diminution du glutathion n'augmente pas la photoinhibition du PSII (Laureau *et al.*, 2011) à la condition que la quantité d'ascorbate et l'activité de la catalase soient suffisantes pour détoxifier les ROS produits. Ca pourrait être le cas chez les jeunes feuilles. Il faut noter que le faible transport électronique en excès chez les feuilles sous la neige est corrélé avec une faible concentration en ascorbate et une faible activité de la catalase.

Si les électrons en excès n'induisent pas la formation de ROS dans les chloroplastes, ils peuvent être évacués par la malate déshydrogénase. Pour des raisons techniques (impossibilité de congeler les feuilles directement sur le site) seule l'activité totale de cette enzyme a été étudiée. On ne peut donc pas discuter de la capacité réelle de la malate déshydrogénase dans la cellule mais seulement son activité potentielle *ex situ*. Cependant, on remarque que cette activité potentielle est beaucoup plus importante chez les jeunes feuilles par rapports aux feuilles âgées et sous la neige. Le flux électronique crée par le biais de la valve malate est de l'ordre de $8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ce qui est loin d'être négligeable et confirme que chez *Soldanella alpina* on ne peut pas considérer les flux alternatifs comme étant nul contrairement au Haricot (Cornic and Briantais, 1991).

Le flux électronique généré par l'activité de la malate déshydrogénase est potentiellement suffisant pour prendre en charge la totalité des électrons excédentaires. C'est donc une voie alternative potentielle mais il faut cependant noter que n'ayant que l'activité potentielle de la NADP-MDH *ex-situ*, il se peut que l'importance de ce flux alternatif soit en réalité plus faible. En particulier, il est sans doute insuffisant pour prendre en charge la totalité du flux électronique excédentaire observé chez les feuilles sous la neige et les feuilles âgées, notamment du fait que l'activité NADH-MDH mesuré est un maximum bien qu'il constitue indéniablement un flux alternatif.

Chez *Soldanella alpina*, on a donc une capacité de dissipation du flux électronique excédentaire qui semble différer en fonction du stade de vie de la plante. Chez les jeunes feuilles, il y a globalement une capacité anti-oxydante très importante et potentiel fort de la valve malate qui pourrait donc constituer un flux électronique alternatif non négligeable. En revanche, les feuilles sous la neige sont capables de réduire le transport électronique total et ainsi régulent leur flux électronique excédentaire. Globalement chez les vieilles feuilles, le transport électronique en excès est le même que chez les jeunes feuilles chez *S.alpina* ou même plus fort chez *G.montanum*. Les vieilles feuilles ne survivant pas en majorité à une deuxième période de végétation (Streb, non publié), il se peut qu'une augmentation des capacités du système antioxydant soit la seule stratégie mise en place par *Soldanella alpina* et *Geum montanum* pour permettre à ses feuilles de contribuer suffisamment en terme de photosynthèse pour la formation des nouvelles feuilles avant d'entrer en sénescence.

Conclusion

Le modèle obtenu précédemment et éprouvé chapitre 3 a été appliqué à deux plantes alpines *Soldanella alpina* et *Geum montanum*. Ces deux plantes ont un cycle de vie similaire, elles gardent leurs feuilles vertes pendant plus d'une année et se retrouvent donc entièrement sous la neige pendant la période hivernale. Lors de la fonte des neiges, les feuilles formées avant la période hivernale se retrouvent alors à affronter une variation brutale de température et de luminosité, passant en quelques jours de -10°C à 40°C tout en étant confronté à une luminosité importante après avoir passé plusieurs mois à l'obscurité.

On a donc voulu savoir s'il était possible de trouver une raison physiologique au succès de ses deux plantes malgré la nécessité pour leurs feuilles à s'acclimater rapidement à des variations brusques qui se révèlent généralement mortelles. On a ainsi cherché à savoir si ces deux plantes étaient capables de réguler leurs transports électroniques, en réponse aux changements rapides des conditions environnementales subies au cours de leur vie, de manière à limiter le transfert des électrons à d'autres accepteurs que la Rubisco. En l'occurrence, dans cette étude on observe chez les deux plantes alpines, *Soldanella alpina* et *Geum montanum* deux acclimations différentes en réponse aux mêmes contraintes climatiques et environnementales.

La première chose qui a été remarqué est la plus faible assimilation du CO₂ et un plus faible flux électronique total (Jt) chez les feuilles de *Soldanella alpina* et *Geum montanum* sous la neige alors qu'aucunes différences notables n'existaient chez les plantes aux feuilles jeunes ou âgées.

Le flux excédentaire que l'on cherchait à calculer est non nul à tout les stades de vie étudiés que ce soit chez *Geum montanum* ou *Soldanella alpina* ce qui montre qu'il existe chez ces plantes un flux électronique vers d'autres accepteurs que la Rubisco. Chez les feuilles sous la neige, à des intensités lumineuses saturantes, on a un flux électronique excédentaire plus faible que dans les autres conditions ce qui semble indiquer une meilleure gestion du flux électronique total malgré une plus grande photoinhibition dans cette condition. Les feuilles sous la neige sont donc capables de générer un flux électronique suffisant au niveau du PSII pour effectuer la photosynthèse tout en limitant les « pertes » d'énergie superflue. Cette bonne gestion du flux électronique passe par un NPQ plus fort et plus rapidement induit (surtout chez *Geum montanum* chez qui un transport cyclique important est également une stratégie d'acclimation) et un transfert rapide de l'énergie du PSII au PSI. On peut observer que cette gestion plus efficace du flux électronique va de paire avec une faible concentration en ascorbate et une activité catalase basse ce qui signifie que le système antioxydant est plus faible.

Chez les jeunes feuilles en formation, on a chez *Soldanella alpina* une protection accrue aux ROS grâce à un ratio chlorophylle/caroténoïde plus important que pour les autres stades de vie, une forte quantité d'ascorbate, une activité ascorbate peroxydase élevée et un flux électronique alternatif fort vers la NADP-MDH.

Les feuilles âgées semblent être efficaces pour garder le PSII oxydé et une chaîne de transport peu réduite ce qui est le reflet d'un transport électronique efficient. Cela se fait chez *Soldanella alpina* grâce à une forte photorespiration et peut être aussi la création d'un flux alternatif vers la NADP-MDH.

Conclusion générale

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'acclimatation de *Soldanella alpina* et dans une moindre mesure à l'acclimatation de *Geum montanum* à deux moments clefs de leur cycle de développement. En effet, ce sont deux plantes qui sont capables de garder leurs feuilles vertes en hiver, sous la neige. Ainsi, à la fonte des neiges, les parties aériennes de ses plantes sont confrontées à des variations extrêmes de températures et de luminosités. En passant de températures négatives à des températures de l'ordre de 40°C couplées à des intensités lumineuses fortes alors qu'elles ont s'étaient longuement adaptées à l'obscurité sous la neige, on s'attendait à observer un stress oxydant important se traduisant par un flux électronique fortement excédentaire. S'il y a bien un flux électronique excédentaire non nul de l'ordre d'une dizaine d'électrons.m⁻².s⁻¹, celui-ci est loin d'être dramatique. *S.alpina* comme *G.montanum* possèdent des stratégies de protections qui leur permettent d'optimiser le flux électronique même en conditions stressantes ou au moins de gérer les ROS qui seraient ainsi générés.

L'intérêt principal pour *S.alpina* et *G.montanum* de garder leurs feuilles vertes en hiver malgré le stress que cela engendre au moment de la fonte de la neige, réside dans le fait qu'elles sont ainsi les premières plantes que l'on retrouve sur les prairies alpines. Ainsi, jusqu'au développement du reste de la végétation caractéristique des prairies alpines, elles peuvent croître sans avoir à subir de compétition au niveau de la disponibilité de la lumière ou des nutriments. Cependant une fois le reste de la végétation développée, *S.alpina* doit s'adapter à des intensités lumineuses faibles. Puis à l'arrivée de l'hiver, les feuilles de *S.alpina* acclimatée à l'obscurité doivent de nouveau s'adapter à des intensités lumineuses alors que la végétation alentours dépérit. Cette acclimatation que l'on a étudiée uniquement chez *S.alpina*, bien que l'on s'attende à retrouver des mécanismes similaires chez *G.montanum*, est donc cette fois uniquement une adaptation à des variations fortes de luminosité. Cette acclimatation passe par une modulation du contenu en antioxydant et une variation des concentrations des composants participants à la photoprotection de la plante comme c'est le cas pour les flavonoïdes.

Due à des contraintes à la fois techniques et logistiques, un certain nombre d'expériences complémentaires n'ont pas pu être menée à terme. Il était en effet prévu d'étudier l'action de la protéine PTOX par le biais d'une étude biochimique (western blot) et des mesures de vitesse de réoxydation du pool de quinone en présence d'inhibiteurs tels de le DCMU ou le DBMIB. Cette protéine déjà connue pour son implication dans la résistance aux stress abiotiques chez les plantes de façon générale et chez certaines plantes alpines de façon plus spécifique était un candidat permettant d'expliquer le succès avec lequel *G.montanum* et *S.alpina* parviennent à survivre à des variations brutales de températures et de luminosités. Au vu des résultats que l'on a pu récoltés au cours de cette thèse, il ne

semble pas que l'implication de PTOX soit un élément majeur de compréhension des capacités d'acclimatation de *S.alpina* et *G.montanum*. Cependant, il n'a pas non plus été possible de réfuter cette hypothèse de travail initial.

Il était également prévu d'étudier la quantité de ROS dans les feuilles des différents échantillons dans les différentes conditions par résonnance paramagnétique électronique par le biais de pièges pour les radicaux hydroxyle et superoxyde. Il aurait été intéressant d'avoir un parallèle entre notre mesure du flux électronique excédentaire et une mesure de la quantité de ROS dans les feuilles.

Enfin, il aurait pu être intéressant de regarder le contenu en flavonoïdes des plantes sous la neige et juste après la fonte des neiges en complément de l'étude effectuée plus tard dans la saison de sorte à avoir une vision d'ensemble de l'évolution de la photoprotection des feuilles de *S.alpina* par le biais de ces composés tout au long de leur cycle de vie et des différentes contraintes et acclimations qu'elles subissent.

Une étude complémentaire de la composition du sol aurait pu nous apporter des informations supplémentaires également par rapport aux flavonoïdes dans la mesure où la composition du sol influence la synthèse de ces derniers.

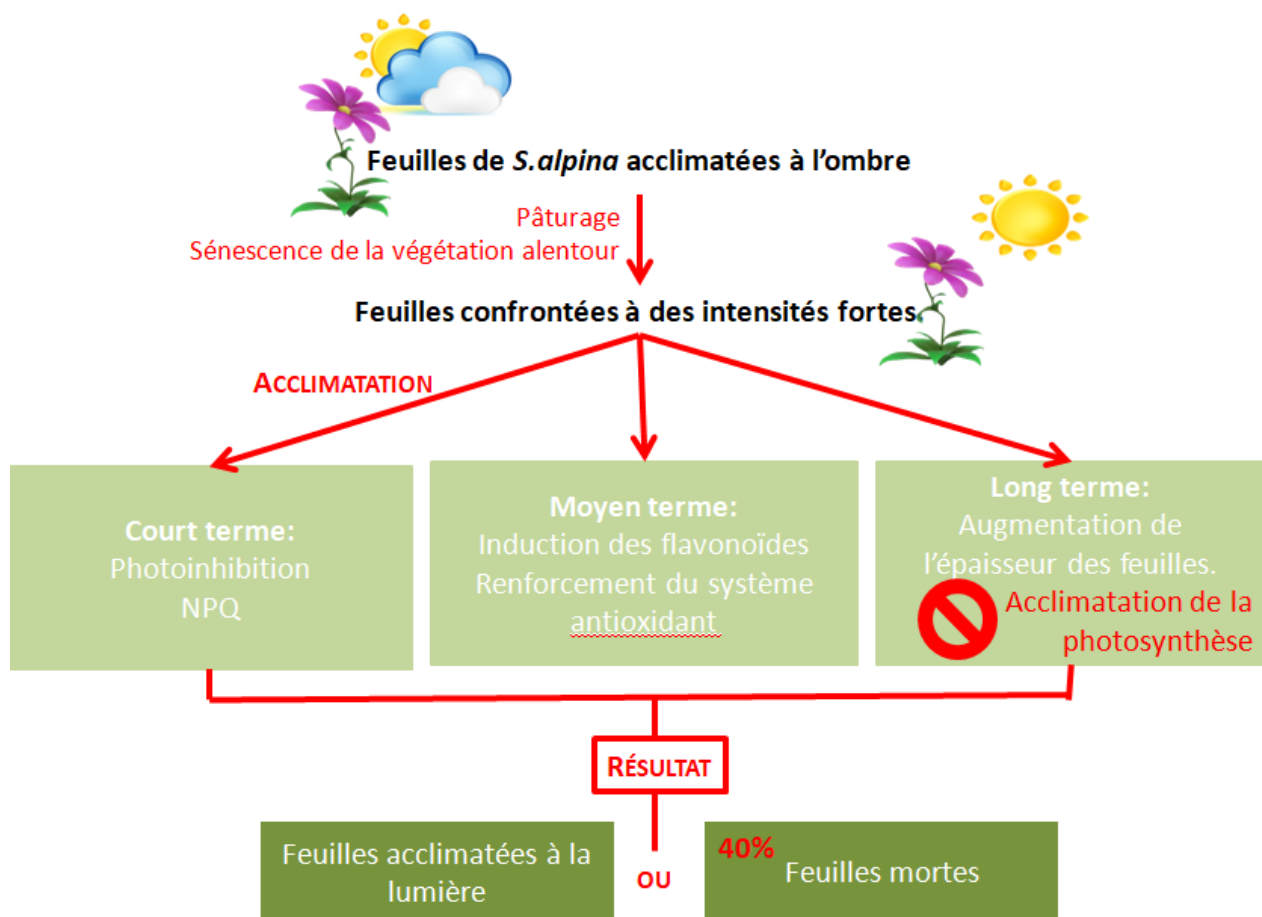


Figure 90: Schéma récapitulatif de l'acclimation des feuilles de *S.alpina* au changement de saison de l'été à l'automne.

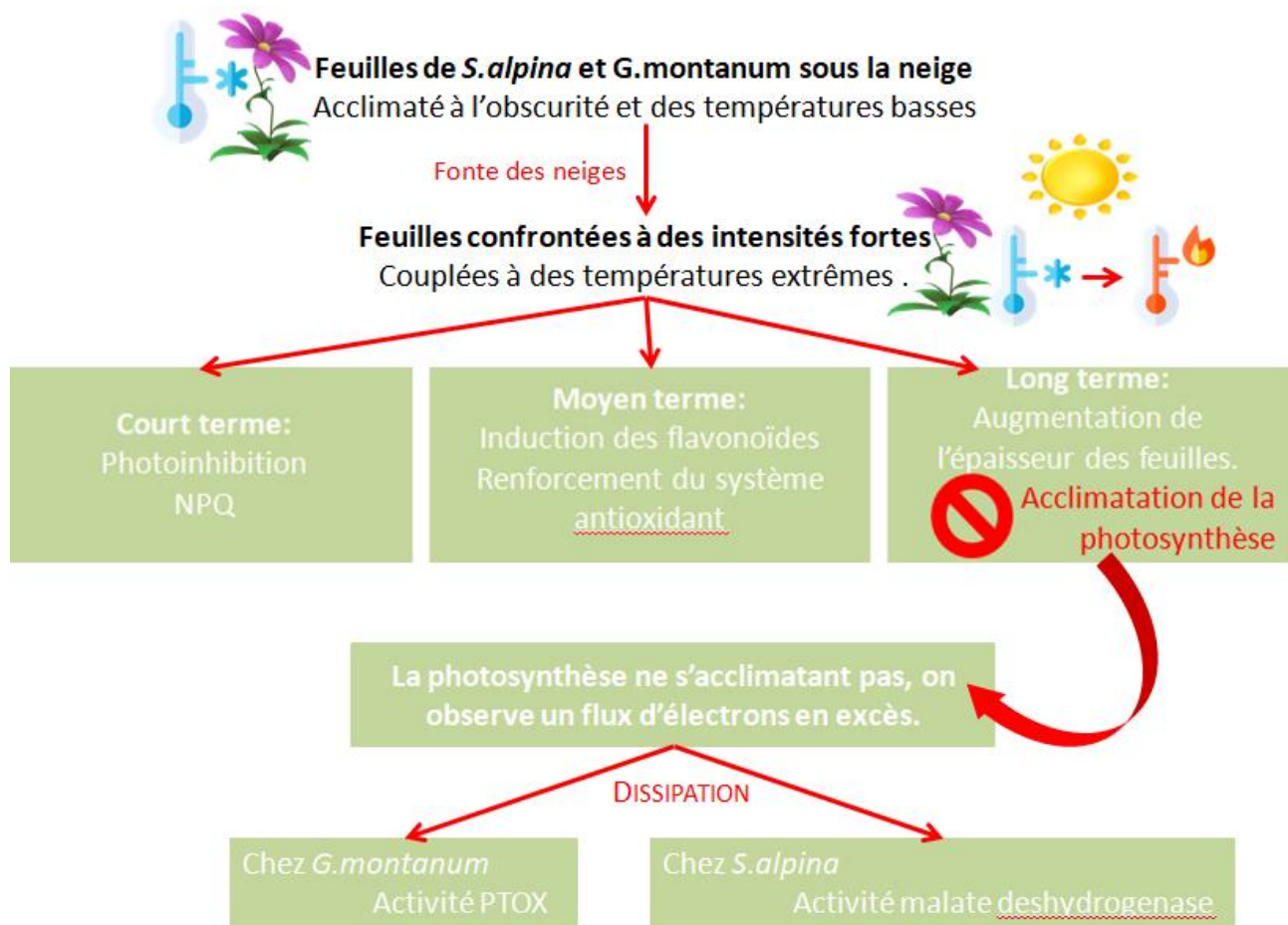


Figure 91: Schéma récapitulatif des résultats de l'études des mécanismes d'acclimation des feuilles de *S. alpina* et *G. montanum* au moment de la fonte des neiges à la fin de l'hiver.

Bibliographie

Abbé Coste, H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Librairie des Sciences et des Arts, Paris.

Abogadallah, G.M., 2011. Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Science: An International Journal Of Experimental Plant Biology* 180, 540-547.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. pp. 67-67-76.

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. pp. 35-35-45.

Agati, G., Tattini, M., 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist* 186, 786-786-793.

Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., 2008. Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum* 133, 199-199-210.

Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., Arndal, M.F., Michelsen, A., 2011. Ambient UV-B radiation reduces PSII performance and net photosynthesis in high Arctic *Salix arctica*.

Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F., 2009. Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions. 176, 768.

Amtmann, A., 2009. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Molecular Plant* 2, 3-12.

Andrizhiyevskaya, E.G., Chojnicka, A., Bautista, J.A., Diner, B.A., van Grondelle, R., Dekker, J.P., 2005. Origin of the F685 and F695 fluorescence in Photosystem II. *Photosynthesis Research* 84, 173-180.

Arbona, V., Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A., 2010. Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. 167, 1342.

Atkin, O.K., Evans, J.R., Ball, M.C., Lambers, H., Pons, T.L., 2000a. Leaf Respiration of Snow Gum in the Light and Dark. Interactions between Temperature and Irradiance. *Plant Physiology* 122, 915-924.

Atkin, O.K., Holly, C., Ball, M.C., 2000b. Acclimation of snow gum (*Eucalyptus pauciflora*) leaf respiration to seasonal and diurnal variations in temperature: the importance of changes in the capacity and temperature sensitivity of respiration. *Plant, Cell & Environment* 23, 15-26.

Atkin, O.K., Tjoelker, M.G., 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8, 343-351.

Atkin, O.K., Westbeek, M., Cambridge, M.L., Lambers, H., Pons, T.L., 1997. Leaf Respiration in Light and Darkness (A Comparison of Slow- and Fast-Growing *Poa* Species). *Plant Physiology* 113, 961-965.

- Aubailly, M., Haigle, J., Giordani, A., Morlière, P., Santus, R., 2000. UV photolysis of catalase revisited: a spectral study of photolytic intermediates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56, 61-67.
- Backhausen, J.E., Kitzmann, C., Scheibe, R., 1994. Competition between electron acceptors in photosynthesis: Regulation of the malate valve during CO₂ fixation and nitrite reduction. pp. 75-75-86.
- Baker, N.R., 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89-113.
- Barrero-Sicilia, C., Silvestre, S., Haslam, R.P., Michaelson, L.V., 2017. Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Science* 263, 194-194-200.
- Bartels, D., Dinakar, C., 2013. Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: a comparison between *Thellungiella* and *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 40, 819-831.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., Timm, S., 2012. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 269-275.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229-1240.
- Bellasio, C., Beerling, D.J., Griffiths, H., 2016. An Excel tool for deriving key photosynthetic parameters from combined gas exchange and chlorophyll fluorescence: theory and practice. *Plant, Cell & Environment* 39, 1180-1180-1197.
- Benina, M., Obata, T., Mehterov, N., Ivanov, I., Petrov, V., Toneva, V., Fernie, A.R., Gechev, T.S., 2013. Comparative metabolic profiling of *Haberlea rhodopensis*, *Thellungiella halophylla*, and *Arabidopsis thaliana* exposed to low temperature.
- Bidel, L., Meyer, S., Talhouet, A.-C., Baudin, X., Daniel, C., Cazals, G., Streb, P., UV-A absorbance, a non-invasive method to assess flavonoid and carotenoid accumulation and leaf structure responses to light acclimation in *Soldanella alpina*. *Plant Physiology and biochemistry PLAPHY-D-19-01924*.
- Bilger, W., Björkman, O., 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.
- Blumthaler, M., 2005. Ambient levels of UV radiation. *BMC Plant Biology* 5, S5.
- Boese, S.R., Huner, N.P.A., 1990. Effect of Growth Temperature and Temperature Shifts on Spinach Leaf Morphology and Photosynthesis. *Plant Physiology* 94, 1830-1830-1836.
- Brestic, M., Cornic, G., Fryer, M.J., Baker, N.R., 1995. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? *planta* 196, 450-457.
- Brooks, A., Farquhar, G., 1985. Effect of temperature on the CO₂/O specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165, 397.

- Buchner, O., Holzinger, A., LÜTZ, C., 2007. Effects of temperature and light on the formation of chloroplast protrusions in leaf mesophyll cells of high alpine plants.
- Bunce, J.A., 1998. The temperature dependence of the stimulation of photosynthesis by elevated carbon dioxide in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 49, 1555-1561.
- Bunce, J.A., 2000. Acclimation to temperature of the response of photosynthesis to increased carbon dioxide concentration in *Taraxacum officinale*. pp. 89-89-94.
- Busch, F.A., Sage, T.L., Cousins, A.B., Sage, R.F., 2013. C3 plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. *Plant, Cell & Environment* 36, 200-212.
- Caemmerer, S.v., 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO.
- Cai, Y., Cao, F., Wei, K., Zhang, G., Wu, F., 2011. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in proteins, ultrastructure and antioxidant defense enzymes in rice seedlings. *Journal of Hazardous Materials* 192, 1056-1066.
- Carol, P., Kuntz, M., 2001. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science* 6, 31-36.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., Kuntz, M., 1999. Mutations in the Arabidopsis Gene IMMUTANS Cause a Variegated Phenotype by Inactivating a Chloroplast Terminal Oxidase Associated with Phytoene Desaturation. *American Society of Plant Physiologists*, p. 57.
- CH, C2SM, M., ETH, NCCR Climate,, OcCC, Z., Switzerland, 2011. Swiss climate change scenarios CH2011.
- Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., Barford, D., 2012. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484, 208-213.
- Cheng, C., Yun, K.-Y., Ransom, H.W., Mohanty, B., Bajic, V.B., Jia, Y., Yun, S.J., de los Reyes, B.G., 2007. An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice. *BMC Genomics* 8, 175-175.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R., 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *the plant journal* 90, 856-867.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S.K., 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* 8, e23681-e23681.
- Cockburn, W., 1983. C3 C4: Mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* 6, 747-748.
- Confortola, G., Soncini, A., Bocchiola, D., 2014. Climate change will affect hydrological regimes in the Alps. *Journal of Alpine research/Revue de géographie alpine*.
- Cornic, G., Baker, N., 2012. Electron Transport in Leaves: A Physiological Perspective. In: Eaton-Rye, J.J., Tripathy, B.C., Sharkey, T.D. (Eds.), *Photosynthesis*. Springer Netherlands, pp. 591-605.
- Cornic, G., Briantais, J.M., 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta* 183, 178-178-184.

- Cornic, G., Ghashghaie, J., 1991. Effect of temperature on net CO₂ assimilation and photosystem II quantum yield of electron transfer of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves during drought stress. *Planta* 185, 255-255-260.
- Crawford, R.M.M., 2008. *Plants at the Margin: Ecological Limits and Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Czarnocka, W., Karpiński, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology & Medicine* 122, 4-4-20.
- De La Casiniere, A., Grenier, J.C., Cabot, T., Werneck-Faga, M., 1993. Altitude effect on the clearness index in the French Alps. *Sol. energy* 51, 93-100.
- Diaz, M., De Haro, V., Munoz, R., Quiles, M.J., 2007. Chlororespiration is involved in the adaptation of Brassica plants to heat and high light intensity. *Plant, cell and environment (Print)* 30, 1578-1578-1585.
- Diffey, B.L., 2002. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28, 4-13.
- Driever, S.M., Baker, N.R., 2011. The water–water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant, Cell & Environment* 34, 837-846.
- Engel, N., Schmidt, M., LÜTZ, C., Feierabend, J., 2006. Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant, cell and environment (Print)* 29, 593-593-607.
- Epron, D., Godard, D., Cornic, G., Genty, B., 1995. Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell & Environment* 18, 43-51.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S., Berry, J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149, 78-90.
- Faverger, C., Robert, P.-A., 1995. Tome 1: étage alpin. Editions Delachaux & Niestlé, Lausanne.
- Feilke, K., Streb, P., Cornic, G., Perreau, F., Kruk, J., Krieger-Liszkay, A., 2016. Effect of *Chlamydomonas* plastid terminal oxidase 1 expressed in tobacco on photosynthetic electron transfer. *the plant journal* 85, 219-228.
- Filella, I., Peñuelas, J., 1999. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *Quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecology* 145, 157-165.
- Flexas, J., Badger, M., Chow, W.S., Medrano, H., Osmond, C.B., 1999. Analysis of the Relative Increase in Photosynthetic O₂ Uptake When Photosynthesis in Grapevine Leaves Is Inhibited following Low Night Temperatures and/or Water Stress. *Plant Physiology* 121, 675.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G., 2009. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60, 455-484.
- Francisco, J.C., Hayet, H., 2016. Differential responses to salt-induced oxidative stress in three phylogenetically related plant species: *Arabidopsis thaliana* (glycophyte), *Thellungiella salsuginea*

and *Cakile maritima* (halophytes). Involvement of ROS and NO in the control of K⁺/Na⁺ homeostasis. 3, 380.

Fridlyand, L.E., Backhausen, J.E., Scheibe, R., 1998. Flux control of the malate valve in leaf cells. pp. 290-290-298.

Galmés, J., Aranjuelo, I., Medrano, H., Flexas, J., 2013. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis Research* 117, 73-90.

Galmes, J., Flexas, J., Keys, A.J., Cifre, J., Mitchell, R.A.C., Madgwick, P.J., Haslam, R.P., Medrano, H., Parry, M.A.J., 2005. Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant, cell and environment* (Print) 28, 571-571-579.

Gamburg, K.Z., Varakina, N.N., Rusaleva, T.M., Tauson, E.L., Rikhvanov, E.G., Borovskii, G.B., Voinikov, V.K., 2011. Comparison of the resistances of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella* (*Thellungiella salsuginea*) suspension cultures to high temperatures. *Doklady Biological Sciences*, 232.

Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 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.

Gerbaud, A., André, M., 1987. An Evaluation of the Recycling in Measurements of Photorespiration. *Plant Physiology* 83, 933-933-937.

Germino, M.J., Smith, W.K., 2000. High resistance to low-temperature photoinhibition in two alpine, snowbank species. *Physiologia Plantarum* 110, 89-95.

Ghotbi-Ravandi, A.A., Shariati, M., Shobbar, Z.-S., Shahbazi, M., 2019. Expression pattern and physiological roles of Plastid Terminal Oxidase (PTOX) in wild and cultivated barley genotypes under drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 162, 313-313-320.

Gong, Q., Li, P., Ma, S., Indu Rupassara, S., Bohnert, H.J., 2005. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 44, 826-839.

Gong, X.Y., Tcherkez, G., Wenig, J., Schäufele, R., Schnyder, H., 2018. Determination of leaf respiration in the light: comparison between an isotopic disequilibrium method and the Laisk method. *New Phytologist* 218, 1371-1382.

Govindjee, G., Papageorgiou, G., 2004. Chlorophyll A Fluorescence: A Signature of Photosynthesis.

Griffith, M., Timonin, M., Wong, A.C.E., Gray, G.R., Akhter, S.R., Saldanha, M., Rogers, M.A., Weretilnyk, E.A., Moffatt, B., 2007. *Thellungiella*: an *Arabidopsis*-related model plant adapted to cold temperatures. *Plant, Cell & Environment* 30, 529-529-538.

Gröbner, J., Albold, A., Blumthaler, M., Cabot, T., De la Casiniere, A., Lenoble, J., Martin, T., Masserot, D., Müller, M., Philipona, R., Pichler, T., Pougatch, E., Rengarajan, G., Schmucki, D., Seckmeyer, G., Sergent, C., Touré, M.L., Weihs, P., 2000. Variability of spectral solar ultraviolet irradiance in an Alpine environment. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105, 26991-27003.

Guan, X.Q., Zhao, S.J., Li, D.Q., Shu, H.R., 2004. Photoprotective Function of Photorespiration in Several Grapevine Cultivars Under Drought Stress. *Photosynthetica* 42, 31-36.

- Guo, Z., Ou, W., Lu, S., Zhong, Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 828-836.
- Hacker, J., Neuner, G., 2006. Photosynthetic Capacity and PSII Efficiency of the Evergreen Alpine Cushion Plant *Saxifraga paniculata* during Winter at Different Altitudes. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 38, 198-205, 198.
- Haupt-Herting, S., Fock, H.P., 2002. Oxygen Exchange in Relation to Carbon Assimilation in Water-stressed Leaves During Photosynthesis. *Annals of Botany* 89, 851-859.
- Heber, U., Bligny, R., Streb, P., Douce, R., 1996. Photorespiration is Essential for the Protection of the Photosynthetic Apparatus of C3 Plants Against Photoinactivation Under Sunlight. *Botanica Acta* 109, 307-315.
- Hollós, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33, 179-197.
- Hossain, M.S., ElSayed, A.I., Moore, M., Dietz, K.-J., 2017. Redox and reactive oxygen species network in acclimation for salinity tolerance in sugar beet. 68, 1283.
- Hurry, V., Keerberg, O., Parnik, T., Oquist, G., Gardestrom, P., 1996. Effect of Cold Hardening on the Components of Respiratory Decarboxylation in the Light and in the Dark in Leaves of Winter Rye. *Plant Physiology* 111, 713-719.
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T.M., Goodwin, S.M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D.W., Jenks, M.A., Rhodes, D., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Joly, R.J., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., 2004. Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology* 135, 1718-1737.
- Ivanov, A.G., Rosso, D., Savitch, L.V., Stachula, P., Rosembert, M., Oquist, G., Hurry, V., Huner, N.P.A., 2012. Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated Arabidopsis thaliana. *Photosynthesis Research* 113, 191-206.
- Javanmardi, J., Rahemi, M., Nasirzadeh, M., 2013. Physiological and reproductive responses of tomato and pepper transplants to low-temperature conditioning. pp. 294-294-310.
- Jean-Marc Tison, B.d.F., Société botanique de France, 2014. Flora Gallica: Flore de France. Biotopé éditions. Mèze.
- Jiang, N., Taylor, J.S., 1993. In vivo evidence that UV-induced C .fwdarw. T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry* 32, 472-481.
- Johnson, G., Murchie, E., 2011. Gas Exchange Measurements for the Determination of Photosynthetic Efficiency in Arabidopsis Leaves #. T Chloroplast Research in Arabidopsis, pp. 311-326.
- Jones, H., H W M Demmers-Derks, H., 1999. Photoinhibition as a factor in altitudinal or latitudinal limits of species. *Phyton Fasc* 39.
- Julve, 2019. Index botanique, écologique et chronologique de la flore de France. Baseflor.

- Karabourniotis, G., Papadopoulos, K., Papamarkou, M., Manetas, Y., 1992. Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum* 86, 414-414-418.
- Kaur, G., Kumar, S., Thakur, P., Malik, J.A., Bhandhari, K., Sharma, K.D., Nayyar, H., 2011. Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage. *Scientia Horticulturae* 128, 174-181.
- Kluger, J., 2017. *The Big Melt: Climate Change In the Alps*. pp. 52-52-57.
- Kobza, J., Edwards, G.E., 1987. Influences of Leaf Temperature on Photosynthetic Carbon Metabolism in Wheat. *Plant Physiology* 83, 69-74.
- Körner, C., Cochrane, P., 1983. Influence of plant physiognomy on leaf temperature on clear midsummer days in the Snowy Mountains, south-eastern Australia.
- Körner, C., Neumayer, M., Menendez-Riedl, S.P., Smeets-Scheel, A., 1989. Functional Morphology of Mountain Plants¹) Dedicated to Prof. H. Meusel, on the occasion of his 80th birthday. *Flora* 182, 353-383.
- Krall, J.P., Edwards, G.E., 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* 86, 180-187.
- Kramer, D.M., Evans, J.R., 2011. The Importance of Energy Balance in Improving Photosynthetic Productivity. *Plant Physiology* 155, 70.
- Kramer, D.M., Evans, J.R., 2011. The Importance of Energy Balance in Improving Photosynthetic Productivity. *Plant Physiol.* 155, 70-78.
- Kramer, G.F., Norman, H.A., Krizek, D.T., Mirecki, R.M., 1991. influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30, 2101-2108.
- Krieger-Liszka, A., Krupinska, K., Shimakawa, G., 2019. The impact of photosynthesis on initiation of leaf senescence. *Physiologia Plantarum* 166, 148-164.
- Kudoh, H., Sonoike, K., 2002. Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. pp. 541-541-548.
- Laing, W.A., Ogren, W.L., Hageman, R.H., 1974. Regulation of Soybean Net Photosynthetic CO₂ Fixation by the Interaction of CO₂, O₂, and Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. *Plant Physiology* 54, 678-685.
- Laisk, A., 1977. Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration of C₃ Plants.
- Larcher, W., Wagner, J., Lütz, C., 1998. effect of heat on photosynthesis, dark respiration and cellular ultrastructure of the arctic-alpine psychrophyte *Ranunculus glacialis*.
- Laternser, M., Schneebeli, M., 2003. Long-term snow climate trends of the Swiss Alps (1931–99). *international Journal of climatology* 23, 733-750.
- Laureau, C., 2012. The role of PTOX in the acclimation of alpine plants to extreme conditions. Université Paris Sud - Paris XI.
- Laureau, C., Bligny, R., Streb, P., 2011. The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Physiologia Plantarum* 143, 246-260.

- Laureau, C., De Paepe, R., Latouche, G., Moreno-ChacÓN, M., Finazzi, G., Kuntz, M., Cornic, G., Streb, P., 2013. Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* L. *Plant, Cell & Environment* 36, 1296-1310.
- Laureau, C., Meyer, S., Baudin, X., Huignard, C., Streb, P., 2015a. In vivo epidermal UV-A absorbance is induced by sunlight and protects *Soldanella alpina* leaves from photoinhibition. *Functional Plant Biology* 42.
- Laureau, C., Meyer, S., Baudin, X., Huignard, C., Streb, P., 2015b. In vivo epidermal UV-A absorbance is induced by sunlight and protects *Soldanella alpina* leaves from photoinhibition. *Functional Plant Biology* 42, 599-608.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses.
- Lichtenberg, M., Trampe, E.C.L., Vogelmann, T.C., Köhl, M., 2017. Light Sheet Microscopy Imaging of Light Absorption and Photosynthesis Distribution in Plant Tissue. *Plant Physiology* 175, 721-733.
- Lütz, C., 2010. Cell physiology of plants growing in cold environments.
- Lütz, C., 2013. Plants in Alpine regions: Cell physiology of adaption and survival strategies.
- Lütz, C., Schönauer, Neuner, G., 2005. Physiological adaptation before and after snow melt in green overwintering leaves of some alpine plants. *Phyton; annales rei botanicae* 45, 139-156.
- Malik, Bilal, T., Tahir, I., Rehman, R., Hakeem, K., Abidin, M., 2013. Plant Signaling: Response to Reactive Oxygen Species.
- Mankin, J.S., Diffenbaugh, N.S., 2015. Influence of temperature and precipitation variability on near-term snow trends. *Climate dynamics* 45, 1099-1116.
- Manuel, N., Cornic, G., Aubert, S., Choler, P., Bligny, R., Heber, U., 1999. Protection against Photoinhibition in the Alpine Plant *Geum montanum*. *Oecologia* 119, 149-149-158.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Mehler, A.H., 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33, 65-77.
- Miginiac-Maslow, M., Lancelin, J.-M., 2002. Intrasteric inhibition in redox signalling: light activation of NADP-malate dehydrogenase. *Photosynthesis Research* 72, 1.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M., 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell & Environment* 26, 845-856.
- Murray, R.B., Susanne von, C., Sari, R., Hiromi, N., 2000. Electron Flow to Oxygen in Higher Plants and Algae: Rates and Control of Direct Photoreduction (Mehler Reaction) and Rubisco Oxygenase. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 355, 1433-1433-1446.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H., 2016. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell and Environment* 39, 1140-1140-1160.

- Noda, H.M., Motohka, T., Murakami, K., Muraoka, H., Nasahara, K.N., 2013. Accurate measurement of optical properties of narrow leaves and conifer needles with a typical integrating sphere and spectroradiometer. *Plant, Cell & Environment* 36, 1903-1909.
- Ogren, W.L., 1984. Photorespiration: Pathways, Regulation, and Modification. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 415-442.
- Ozenda, P., 1985. La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen. Edition Masson.
- Perez-Torres, E., Bravo, L.A., Corcuera, L.J., Johnson, G.N., 2007. Is electron transport to oxygen an important mechanism in photoprotection? Contrasting responses from Antarctic vascular plants. *Physiologia Plantarum* 130, 185-194.
- Pérez-Torres, E., Dinamarca, J., Bravo, L., Corcuera, L., 2004. Responses of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. to high light and low temperature. *Polar Biol* 27, 183-189.
- Peterson, M.E., Daniel, R.M., Danson, M.J., Eisenthal, R., 2007. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem J* 402, 331-337.
- Pettorelli, N., Pelletier, F., von Hardenberg, A., Festa-Bianchet, M., Côté, S., 2007. Early onset of vegetation growth vs. rapid green-up: Impacts on juvenile mountain ungulates. *Ecology* 88, 381-390.
- Pfündel, E.E., Pan, R.-S., Dilley, R.A., 1992. Inhibition of Violaxanthin Deepoxidation by Ultraviolet-B Radiation in Isolated Chloroplasts and Intact Leaves. *Plant Physiology* 98, 1372.
- Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149-156.
- 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 (English). *Biochimica et biophysica acta* 975, 384-394.
- Priault, P., Tcherkez, G., Cornic, G., De Paepe, R., Naik, R., Ghashghaie, J., Streb, P., 2006. The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases photorespiration through an increased internal resistance to CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* 57, 3195-3207.
- Qiuying, P., Sixue, C., Shaojun, D., Yazhou, C., Yang, W., Xiufeng, Y., 2010. Comparative Proteomics of Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research* 9, 2584.
- Quattrocchio, F., Baudry, A., Lepiniec, L., Grotewold, E., 2006. The science of flavonoids. 97-122.
- Quiles, M.J., 2006. Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant, Cell & Environment* 29, 1463-1470.
- Quinn, P.J., 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22, 128-128-146.
- Rafael, V., Held, A.A., José, M., 1995. Dark Leaf Respiration in Light and Darkness of an Evergreen and a Deciduous Plant Species. *Plant Physiology* 107, 421-421-427.

- Ren, H.-X., Wang, Z.-L., Chen, X., Zhu, Y.-L., 1999. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. *Environmental and Experimental Botany* 42, 51-59.
- Robert, R.W., Aubrey, W.N., 1987a. Chilling-Enhanced Photooxidation: Evidence for the Role of Singlet Oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and Endogenous Antioxidants. *Plant Physiology* 83, 278-278-282.
- Robert, R.W., Aubrey, W.N., 1987b. Chilling-Enhanced Photooxidation: The Peroxidative Destruction of Lipids during Chilling Injury to Photosynthesis and Ultrastructure. *Plant Physiology* 83, 272-272-277.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L.O., Caldwell, M., 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 22-28.
- Ruban, A.V., Johnson, M.P., Duffy, C.D.P., 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817, 167-181.
- Ruuska, S.A., Badger, M.R., Andrews, T.J., von Caemmerer, S., 2000. Photosynthetic electron sinks in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco: little evidence for significant Mehler reaction. *Journal of Experimental Botany* 51, 357-368.
- Scheibe, R., 1991. Redox-modulation of chloroplast enzymes : a common principle for individual control. pp. 1-1-3.
- Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V., Holtgreffe, S., 2005. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. pp. 1481-1481-1489.
- Schöner, W., Koch, R., Matulla, C., Marty, C., Tilg, A.M., 2019. Spatiotemporal patterns of snow depth within the Swiss-Austrian Alps for the past half century (1961 to 2012) and linkages to climate change. pp. 1589-1589-1603.
- Sharkey, T.D., 1988. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum* (København. 1948) 73, 147-147-152.
- Sharma, A., 2014. Differential regulation of salt tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* (Salsuginea).
- Somerville, C.R., Ogren, W.L., 1980. Photorespiration Mutants of *Arabidopsis thaliana* Deficient in Serine-Glyoxylate Aminotransferase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 2684-2684-2687.
- Somerville, C.R., William, L.O., 1981. Photorespiration-Deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. *Plant Physiology* 67, 666-666-671.
- Stepien, P., Johnson, G.N., 2009. Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte *Arabidopsis* and the Halophyte *Thellungiella*: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink. *Plant Physiology* 149, 1154-1165.
- Streb, P., Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., 2003. Cold- and light-induced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* (København. 1948) 118, 96-96-104.
- Streb, P., Cornic, G., 2011. Photosynthesis and Antioxidative Protection in Alpine Herbs. pp. 75-97.

- Streb, P., Cornic, G., 2012. Photosynthesis and Antioxidative Protection in Alpine Herbs. In: Lütz, C. (Ed.), *Plants in Alpine Regions: Cell Physiology of Adaption and Survival Strategies*. Springer Vienna, Vienna, pp. 75-97.
- Streb, P., Feierabend, J., Bligny, R., 1997. Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant, cell and environment (Print)* 20, 1030-1030-1040.
- Streb, P., Josse, E.-M., Gallouët, E., Baptist, F., Kuntz, M., Cornic, G., 2005. Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant, Cell & Environment* 28, 1123-1135.
- Streb, P., Shang, W., Feierabend, J., Bligny, R., 1998. Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207, 313-324.
- Strid, Å., Chow, W.S., Anderson, J.M., 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020, 260-268.
- Szilárd, A., Sass, L., Deák, Z., Vass, I., 2007. The sensitivity of Photosystem II to damage by UV-B radiation depends on the oxidation state of the water-splitting complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767, 876-882.
- Talhouët, A.-C., Meyer, S., Baudin, X., Streb, P., Dynamic acclimation to sunlight in an alpine plant, *Soldanella alpina* L. *Physiologia Plantarum* 0.
- Talhouët, A.C., Meyer, S., Baudin, X., Streb, P., 2019. Dynamic acclimation to sunlight in an alpine plant, *Soldanella alpina* L.
- Tallón, C., Quiles, M.J., 2007. Acclimation to heat and high light intensity during the development of oat leaves increases the NADH DH complex and PTOX levels in chloroplasts. *Plant Science* 173, 438-438-445.
- Tcherkez, G., Gauthier, P., Buckley, T.N., Busch, F.A., Barbour, M.M., Bruhn, D., Heskell, M.A., Gong, X.Y., Crous, K.Y., Griffin, K., Way, D., Turnbull, M., Adams, M.A., Atkin, O.K., Farquhar, G.D., Cornic, G., 2017. Leaf day respiration: low CO₂ flux but high significance for metabolism and carbon balance. *New Phytologist* 216, 986-986-1001.
- Theurillat, J.-P., Guisan, A., 2001. Potential Impact of Climate Change on Vegetation in the European Alps: A Review. *Climatic Change* 50, 77-109.
- Trouillard, M., Shahbazi, M., Moyet, L., Rappaport, F., Joliot, P., Kuntz, M., Finazzi, G., 2012. Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817, 2140-2148.
- Urbach, W., Rupp, W., Sturm, H., 1983. *Praktikum zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme.
- Vass, I., Szilárd, A., Sicora, C., 2005. 43 Adverse Effects of UV-B Light on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus.
- Villar, R., Held, A.A., Merino, J., 1994. Comparison of Methods to Estimate Dark Respiration in the Light in Leaves of Two Woody Species. *Plant Physiology* 105, 167-172.

- Volkov, V., Amtmann, A., 2006. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K⁺/Na⁺ homeostasis under salinity stress. *Plant Journal* 48, 342-353.
- Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A.S., 2013. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* 15, 713-722.
- Walker, B.J., Ort, D.R., 2015. Improved method for measuring the apparent CO₂ photocompensation point resolves the impact of multiple internal conductances to CO₂ to net gas exchange. *Plant, Cell and Environment* 38, 2462-2474.
- Wang, B., Davenport, R.J., Volkov, V., Amtmann, A., 2006. Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57, 1161-1170.
- Waszczak, C., Carmody, M., Kangasjärvi, J., 2018. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69.
- Weis, E., 1985. Chlorophyll fluorescence at 77 K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. *Photosynthesis Research* 6, 73-86.
- Wiczarz, M., Gubernator, B., Kruk, J., Niewiadomska, E., 2015. Enhanced chloroplastic generation of H₂O₂ in stress-resistant *Thellungiella salsuginea* in comparison to *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 153, 467-476.
- Wildi, B., Lütz, C., 1996. Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, cell and environment (Print)* 19, 138-146.
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C., 2000a. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1517-1529.
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C., 2000b. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 355, 1517-1529.
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. pp. 218-218-223.
- Wolfgang, B., Mari, R., Line, N., 2007. UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6, 190-190-195.
- Yao, L.H., JIANG, Y.M., SHI, J., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S.S., 2004. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59, 113-122.
- Young, A.J., 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* 83, 702-702-708.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., Sun, G., Dai, S., 2011. Physiological and Proteomic Analysis of Salinity Tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research* 10, 3852-3870.
- Yugo, L.-M., Vicente, T.C.B.A., Ana, K.M.L., Rachel, H.V.S., Mikko, T., Eva-Mari, A., Joaquim, A.G.S., Peter, J.G., 2019. Photoinhibition of Photosystem I Provides Oxidative Protection During Imbalanced Photosynthetic Electron Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 10.

- Zhang, S., Scheller, H.V., 2004. Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. pp. 1595-1595-1602.
- Zhang, X.D., Wang, R.P., Zhang, F.J., Tao, F.Q., Li, W.Q., 2013. Lipid profiling and tolerance to low-temperature stress in *Thellungiella salsuginea* in comparison with *Arabidopsis thaliana*. 57, 149.
- Zhao, X., Tan, H.J., Liu, Y.B., Li, X.R., Chen, G.X., 2009. Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus (English). *Plant cell, tissue and organ culture* 98, 97-103.
- Zhu, J.-K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66-71.