



Rôle des trichomes et des composés organiques volatils dans le dépôt d'ozone et la réponse des plantes de tomate au stress

Nafissa Dehimeche

► To cite this version:

Nafissa Dehimeche. Rôle des trichomes et des composés organiques volatils dans le dépôt d'ozone et la réponse des plantes de tomate au stress. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG009 . tel-03343979

HAL Id: tel-03343979

<https://theses.hal.science/tel-03343979>

Submitted on 14 Sep 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Filière EFSA- Écologie Fonctionnelle et Sciences Agronomique

École doctorale GAIA

Unité de recherche Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive

Rôle des trichomes et des composés organiques volatils dans le dépôt d'ozone et la réponse des plantes de tomate au stress

Présentée par Nafissa DEHIMECHE
Le 24 Mars 2021

Sous la direction de Michael STAUDT

Devant le jury composé de

M. Jean-Luc Verdeil, DR, CIRAD, Montpellier

M. Dominique Serça, PR, laboratoire d'Aérodologie, Toulouse

M. Romain Larbat, CR, laboratoire Agronomie et Environnement, Lorraine

Mme. Hélène Gautier, DR, INRAE, Avignon

M. Christophe Boissard, MDC, Université de Paris, Paris

M. Michael Staudt, CR, CEFE, Montpellier

Mme Nadia Bertin, DR2, INRAE, Avignon

Président de jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrante de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

RESUME

L'ozone (O_3) est un gaz à effet de serre et un polluant atmosphérique, qui peut, à concentrations élevées, avoir des conséquences importantes sur la croissance et la productivité des écosystèmes agricoles et forestiers. Cependant, la sensibilité des plantes à l' O_3 diffère en fonction de leurs caractéristiques écophysiologiques, morphologiques et biochimiques. Dans mon travail de thèse, j'ai cherché à améliorer notre compréhension des traits de résistance de la tomate à l'ozone, notamment à travers les propriétés des trichomes qui sont des réservoirs de COV capables de réagir avec l'ozone. La stratégie de recherche a consisté à analyser la variabilité des émissions des COV et leurs origines chez les 8 génotypes parents de la population MAGIC TOM présentant une grande variabilité génétique. Cette étude a souligné le faible taux d'émissions constitutives chez la tomate. Elle a été suivie d'analyses micro-morphologique et histochimique des trichomes sur des parents et leurs mutants associés pour analyser leur rôle dans la destruction d'ozone et la résistance des plantes. Les parents sauvages et leurs mutants associés étaient contrastés en composition, morphologie, type et densité de trichomes. J'ai mesuré les principaux dépôts d'ozone (cuticulaire, stomatique, et chimique) à travers la réaction des COV avec l'ozone en phase gazeuse. Les réponses des plantes au stress oxydatif ont été mesurées par des changements de la photosynthèse, de la conductance stomatique, du ratio F_v/F_m et par la quantification des dommages visibles, ainsi que par des mesures des émissions de COV et de leurs teneurs pendant et après l'exposition à différentes concentrations d'ozone. Les réponses des plantes différaient selon les génotypes. Globalement il a été observé en réponse au stress oxydatif, une diminution de la photosynthèse, la formation de COV LOX et des lésions physiques. Nos résultats soulignent le faible rôle de la destruction d'ozone par réaction avec les COV en phase gazeuse et le rôle de la densité des trichomes glandulaires et non glandulaires dans la résistance des plantes. En outre, une certaine résistance à l'ozone observée chez un mutant déficient en nombreux monoterpènes et sesquiterpènes suggère que d'autres métabolites secondaires ayant une forte réactivité et capacité à faire face au stress oxydatif sont impliqués. Les résultats ont permis de discuter le rôle des trichomes et des COV constitutifs des plantes de tomates dans la destruction de l' O_3 . La comparaison des mutants et des parents sauvages ayant des trichomes et des émissions de COV distincts est une approche pertinente pour évaluer le pouvoir protecteur de ces traits contre l'ozone. De fait, une meilleure exploitation des trichomes et des métabolites secondaires (COV et CONV) en production végétale pourrait permettre une résistance accrue des plantes face au stress oxydatif.

Mots clés : Ozone, tomate, COV, monoterpènes, sesquiterpènes, stress oxydatif, dépôt d'ozone, trichomes glandulaires.

Ozone (O₃) is a greenhouse gas and an air pollutant that can, at high concentrations, significantly impact the growth and productivity of agricultural and forest ecosystems. However, the sensitivity of plants to O₃ differs according to their ecophysiological, morphological and biochemical characteristics. In my PhD work, I have sought to improve our understanding of resistance of tomatoes to ozone, in particular through the properties of trichomes which are reservoirs of VOCs capable of reacting with ozone. The research strategy consisted in analyzing the variability of VOC emissions and their origins in the 8 parent genotypes of the MAGIC TOM population with high genetic variability. This study mainly highlighted the low constitutive emissions of tomato. It was followed by micro-morphological and histochemical analysis of trichomes on parents and their associated mutants to analyze their role in ozone depletion and plant resistance. Wild parents and their associated mutants were contrasted in trichome composition, morphology, type and density. I have measured the main ozone deposition (cuticular, stomatal, and chemical) through the gas-phase reaction of VOCs with ozone. Plant responses to oxidative stress were measured through changes in photosynthesis, stomatal conductance, Fv/Fm ratio and quantification of visible damage, as well as measurements of VOC emissions during and after exposure to different ozone concentrations. Plant responses differed according to the phenotypes analyzed. Overall, photosynthetic falls, VOC LOX were formed and physical damages were observed in response to oxidative stress. Our results underline the weak role of VOCs in ozone destruction by gas phase reaction and outline the role of the density of glandular and non glandular trichomes in plant resistance. In addition, the resistance to ozone observed in a mutant deficient in numerous monoterpenes and sesquiterpenes suggests that other secondary metabolites with high reactivity and ability to cope with oxidative stress are involved. The results allowed to discuss the role of trichomes and constituent VOCs of tomato plants in O₃ destruction. Comparison of mutants and wild relatives with distinct trichomes and VOC emissions is a relevant approach to assess the protective power of these traits against ozone. Indeed, better exploitation of trichomes and secondary metabolites (VOC and NVOC) in plant production could lead to increased plant resistance to oxidative stress.

Keywords: Ozone, tomato, VOC, monoterpenes, sesquiterpenes, oxidative stress, ozone deposition, glandular trichomes.

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Michael Staudt qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et m'encadrer pendant ce projet et de m'avoir donné la chance de réaliser la thèse dans un domaine qui ne m'était pas vraiment familier et dans lequel j'ai beaucoup appris. Dans un deuxième temps, je remercie ma co encadrante Nadia Bertin pour la qualité de ses conseils, pour sa disponibilité et son écoute. Merci d'avoir été disponible malgré la distance qui nous séparait.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, qui ont acceptés d'évaluer ce travail, pour l'échange constructif lors de la soutenance et les recommandations pour l'amélioration du manuscrit. Je tiens à remercier Ms Romain Larbat et Dominique Serca d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et de juger cette thèse. Je remercie également Mme Hélène Gautier, et Ms Christophe Boissard d'avoir accepté d'examiner ce travail, et pour leurs remarques très constrictives. Je remercie Ms Jean Luc Verdeil pour son aide précieux pour la réalisation de la partie imagerie de la thèse, et pour son accueil dans la plateforme PHIV de cirad. Merci également d'avoir accepté être référent de comité de la thèse et président de jury de soutenance. Je tiens également à dire un merci bien aux membres de comité de thèse Mme Raluca Ciuraru, Ms Luc Bidel et Mme Anne Charpentier pour leur soutien, d'orientation, de l'enthousiasme et les critiques constructives au cours de cette étude. Je remercie l'ensemble de l'administrateur de secrétariat du CEFÉ, notamment Mme Bruno Florence et l'équipe de service informatique.

Lors de mes recherches, j'ai bénéficié d'un encadrement technique de qualité. Le travail n'aurait jamais pu être complété sans l'utilisation du GC-MS, je remercie Bruno Buatois pour le temps qu'il m'a accordé pour me former sur cette machine, pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie également David Degueldre pour son aide technique, merci d'avoir répondu toujours présent au cas de besoin, merci à Thierry, Pauline, Pierrick et toute l'équipe TE qui ont supervisé le bon fonctionnement des serres et répondaient présents dans le cas de besoin. Je tiens à remercier Marc Lartaud, Geneviève Conejero et

REMERCIEMENTS

Christelle Baptiste de la plateforme PHIV de Cirad pour leurs aides et leurs conseils. Je remercie Béatrice Bunel de l'équipe PSH de INRAE d'Avignon pour les différents semis de plantes de tomate toute au long de cette thèse, je tiens à remercier également Isabelle Bernad pour la réalisation des images des trichomes par MEB. Je dis merci également à Magali Proffit et Candice Dubuisson pour leur aide sur les analyseurs de l'ozone.

C'est le moment de remercier l'ensemble de l'équipe Forecast avec qui j'ai passé les 3 ans et demi de la thèse. Merci pour votre accueil, la convivialité et la bonne ambiance. Pour les pauses fort sympathiques en salle café, et pour tout les soirées et les sorties. Merci à Iris de m'avoir écoutée et remonté le moral quand j'en avais besoin ! Merci pour tes relectures de la thèse et de la présentation de soutenance, contente de faire ta connaissance et ton amitié. Merci à Thomas pour ta gentillesse, ton écoute, tes conseils, et les pauses indéterminées dans les 4 coins de CEFE, et toutes nos discussions diverses. Merci à Juliane pour ton écoute, ton partage d'expériences..., ton soutien et tous les bons moments passés au bureau pendant les trois ans de la thèse. Merci à Maude pour ton soutien, merci de m'avoir accompagnée tard le soir au bureau et partager les soirées pizza. Merci à Julie pour ton soutien et pour les discussions diverses et variées, pour ta gentillesse, et tes orientations, merci d'avoir venue m'accompagner au bureau les derniers mois de la thèse et d'écouter mes nouvelles. Merci Jean Marc L, Jean Marc O pour votre bienveillance, la bonne humeur, vos conseils et votre soutien. Merci à Florent et Xavier pour la bonne humeur et toutes les blagues. Merci à Swanni pour ton soutien et ta gentillesse malgré la distance qui nous séparait. Merci à Lillian pour ta gentillesse et ton aide au dernier moment pour préparer et faire marcher la visioconférence de la soutenance. Merci à Anjelica, les petits trois mois partagés ensemble étaient riches en calories, merci pour tes bonnes pâtisseries, la relève est assurée. Merci à Jean pour ton soutien et ta gentillesse. Merci à Isabelle, Florence et Pascal pour votre gentillesse. Merci à Ammar pour ton écoute, ton soutien et tes conseils en stat. Je vous souhaite à tous bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.

Merci à mes amis-es: Hadjer, tu étais présente tout au long de ces trois ans, au point

REMERCIEMENTS

où tu as appris par cœur la définition des COV, au delà de ça tu connais même le nombre de pages de chaque chapitre de ma thèse ! Merci pour ton soutien. Merci à Ryma, Sohaib, Melha, pour votre soutien. Merci à vous tous, Chacun-e d'entre vous m'a donné de son temps, m'a transmis une part de ses compétences.

Mes derniers remerciements seront pour ma famille :

A ma maman et mes sœurs Nadjat et Samira. Merci de m'avoir soutenue et supportée durant mes études, d'avoir toujours été là pour moi (presque chaque soir de ces trois de thèse, plutôt trois ans et demi !). Merci de m'avoir donné la force et de croire en moi. Merci à mes frères Abdellah et Zaki qui ont très vite compris que les questions concernant l'avancement de la thèse n'étaient pas trop les bienvenues. Une pensée spéciale à mon papa, j'aurai aimé que tu puisses lire ce manuscrit et voir ta fille docteure. J'espère que, de là où tu es, tu es fier de moi.

En terminant, je souhaite démontrer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	14
1. Les différentes classes de COV biogéniques produits et émis par les plantes	14
1.1. Classification selon les voies de biosynthèse	15
1.1.1. Les isoprénoïdes	15
1.1.2. Phénylpropanoïdes et benzénoïdes	16
1.1.3. COV d'autres origines métaboliques	16
1.1.4. Composés de surface des feuilles	17
1.1.5. Composés de stress et dérivés d'acides gras	17
1.2. Classification selon la source d'émission (constitutive ou induite)	19
1.3. Classification selon le site de biosynthèse (Stockage ou synthèse de novo)	19
2. Les facteurs influençant l'émission des COV par les plantes	19
2.1. Les effets à court-terme de la température, de la lumière et du CO ₂	19
2.2. Les effets à long terme de la disponibilité en eau et en nutriments et des stress biotiques	20
3. Processus de stockage et d'émissions des COV au niveau de la plante	21
4. Rôles éco-physiologiques des COV	21
4.1. Participation à la reproduction des plantes	21
4.2. Défense contre le stress biotique	22
4.2.1. Action de défense directe	22
4.2.2. Action indirecte	22
4.3. Implication dans la réponse aux stress abiotiques	23
5. Structures de stockage des COV : trichomes	24
6. COV et la chimie atmosphérique	26
7. Formation de l'ozone	27
8. Interactions entre stress oxydatif causé par l'ozone et les différents systèmes antioxydants et de défense	32
8.1. Acide ascorbique et dérivées	33
8.2. Implication des trichomes et leurs exsudats dans la protection contre l'ozone	34
8.3. Implication d'autres traits l'anatomie et morphologie de feuilles	37
9. Effet de l'ozone sur les émissions des COV	37
10. Tomate : plante modèle	38
Objectifs scientifiques de la thèse et stratégies de recherche	41
Chapitre I. Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato	45
1. Introduction	46
2. Results	47

TABLE DES MATIERES

3. Discussion	53
4. Materials and Methods	56
Chapitre II. Identification et quantification des émissions de COV constitutives des parents sauvages et de leurs mutants chez la tomate- Etude morphologique et histochimique des trichomes- Localisation des principaux COV dans les trichomes	64
1. Criblage des émissions de COV constitutifs des parents sauvages de tomate et de leurs mutants	65
1.1 Résultats d'analyse des émissions des COV constitutives des parents sauvages et leurs mutants	66
1.2 Analyse des teneurs des COV à la surface des feuilles des parents sauvages et leurs mutants	68
1.3. Analyses d'autres métabolites (sucres, vitamine C, polyphénols et flavonoïdes) chez Castelmart et Odorless	69
2. Caractérisation morphologique et histochimique des trichomes	70
2.1. Analyse micromorphologique des trichomes par microscope électronique à balayage MEB	71
2.2. Coloration histochimique	71
2.2.1. Coloration des terpènes au NaDI (Naphthol Dimethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride)	71
2.2.2. Coloration des aldéhydes au réactif de SCHIFF (fuchsine basique)	72
2.3. Résultats de Morphologie des trichomes	72
2.4. Résultats des analyses histochimiques	74
2.4.1. Coloration par le réactif de NaDI	75
2.4.2. Coloration par le réactif de Schiff	76
3. Localisation des principaux COV stockés dans les trichomes	77
4. Discussion	81
Chapitre III. Le rôle des trichomes et les COV dans la réponse de la plante au stress oxydatif causé par l'ozone	86
1. Matériels et méthodes	86
1.1. Déroulement de l'expérimentation, système de mesure du dépôt d'O ₃ plante total et du dépôt d'O ₃ chimique	86
1.2. Calcul de la photosynthèse, transpiration et conductance stomatique	89
1.3. Calculs des dépôts d'O ₃	90
1.4. Echantillonnage et analyse des COV	92
1.5. Mesure des teneurs en chlorophylle et Fv/Fm	93
1.6. Mesure des teneurs des COV après l'exposition des plantes à l'ozone	93
1.7. Quantification des dommages visibles sur les feuilles	93
1.8. Mesure de dépôt d'O ₃ chimique après application d'un stress mécanique sur la	93

TABLE DES MATIERES

plante	
1.9. Traitement et analyse des données	94
2. Résultats	95
2.1. Comparaison entre Cervil et LA0147	95
2.2. Comparaison entre les parents sauvages et leurs mutants	100
2.2.1. Comparaison entre Castelmart et son mutant Odorless	101
2.2.2. Comparaison entre Ailsa craig et son mutant GCR337	108
2.2.3. Comparaison entre Maofen B02 et son mutant Maofen B02 poilu	115
2.3. Teneurs en chlorophylle, pourcentage de diminution de Fv/Fm et pourcentage de surface endommagée chez les parents et leurs mutants	121
2.4. Teneur des COV après l'exposition des plantes au stress oxydatif chez les parents et leurs mutants	122
3. Discussion	125
Discussion générale	139
Conclusion et perspectives	147
Références bibliographiques	149
Annexes	170
Annexe chapitre I	170
Annexe chapitre II	177
Annexe chapitre III	179

LISTE DES ABREVIATIONS

Acronymes

ANOVA : Analyse de variance
AOS : Aérosols Organiques Secondaires
AOT40 : Accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb (dose cumulative d'ozone au-dessus du seuil de concentration d'ozone de 40 ppb)
BTP : Bâtiment et travaux publics
COV : Composé Organique Volatil
COVO : Composé Organique Volatil Oxygéné
DHA : Déhydroascorbate
DMADP: Dimethylallyl diphosphate
DNPH: 2, 4-dinitrophénylhydrazine
DOXP: 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
FACE : Free-Air CO₂ Enrichement (système de fumigation à l'air libre)
FAO: Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
FDP : Diphosphate de farnésyle
Fv/Fm : Rendement quantique maximal du photosystème II
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
GDP : Diphosphate de géranyle
GGDP : Diphosphate de géranylgeranyle
GLV : Green leaf volatiles, volatiles des feuilles vertes
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HPLA : L'acide 13-hydroperoxy linolénique
HPLC : Chromatographie en phase liquid haute performance
LMA : Leaf dry mass per projected leaf area
LOX : Lypogénase
MEB : Microscope électronique à balayage
MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate plastidial
MS: matière sèche
MTBE: Méthyl tertiary-butyl ether
MVA : Mévalonate
N₂O₅: Pentoxyde d'azote
NaDi : Naphthol Dimethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NIST: National Institute of Standards Technology
NO: Monoxyde d'azote
NO₃: Radical nitrate
NO_x: Oxydes d'azote
O₂⁻ : Superoxyde
O₃ : Ozone
OH : Radical hydroxyle
PAL : Phénylalanine Ammonia Liase
PAN : Nitrates de peroxyacétyles
Phiv : plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale
PPb : Parties par milliards, en volume

LISTE DES ABREVIATIONS

PPFD : Photosynthetic photon flux density (densité de flux de photons photosynthétiques)

PSII : Photosystème II

PTR-MS : Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry

QTL : Quantitative trait locus (locus à effets quantitatifs)

ROS : Reactive oxygen species, en anglais, les espèces réactives à l'oxygène

Rubisco: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase S

SCHIFF : fuchsine basique

SEM : Standard Erreur à la moyenne

TPS : Terpènes synthases

UV : Ultra-violet

16:0 : acide hexadécanoïque

18:0 : acide octadécanoïque

1O₂ : l'oxygène singulet

Nomenclatures

F : débit (L/min)

P : pression (Pa)

T : température

t : temps (s)

V : volume (L)

λ : longueur d'onde (m)

k : constante de vitesse (cm³molecule⁻¹s⁻¹)

A : assimilation nette de CO₂

gs : conductance stomatique à la vapeur d'eau

ΦO₃P : dépôt d'ozone par plante

ΦO₃S_{tot} : dépôt d'ozone surfacique total

ΦO₃cutic : dépôt d'ozone cuticulaire

ΦO₃gs : dépôt d'ozone stomatique

ΦO₃chim : dépôt d'ozone chimique

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Structure de quelques COV isoprénoides.	16
Figure 2. Description simplifiée des voies métaboliques de la biosynthèse des COV.	18
Figure 3. Représentation schématisée de l'influence du rayonnement et de la température sur le taux de synthèse des COV et leur émission.	20
Figure 4. Rôle éco-physiologique des COV émis par les parties aériennes et souterraines des plantes.	23
Figure 5. Morphologie et longueur des 8 types de trichomes chez la tomate.	24
Figure 6. Morphologie détaillée des deux trichomes glandulaires les plus abondants.	25
Figure 7. Réactions troposphériques de formation de certains polluants secondaires.	27
Figure 8. Cycle de formation de l'O ₃ troposphérique.	29
Figure 9. Mécanisme simplifié de la photo-oxydation atmosphérique des COV.	29
Figure 10. Les volets les plus importants des effets de l'O ₃ sur les feuilles des plantes.	30
Figure 11. Les trois principaux dépôts d'O ₃ sur la plante.	32
Figure 12. Système antioxydant cellulaire.	34

Chapitre II

Figure 1. Somme des émissions des COV, monoterpènes MNT, et de sesquiterpènes SQT chez les parents et leurs mutants.	66
Figure 2. Teneur des COV chez les parents et leurs mutants.	68
Figure 3. Images des trichomes foliaires (surface abaxiale) réalisées par MEB sur 3 génotypes sauvages de tomate et 3 de leurs mutants.	73
Figure 4. Trichomes après coloration au NaDI.	75
Figure 5. Trichomes après coloration au Schiff.	76
Figure 6. Localisation des principaux composés stockés dans les trichomes par déconvolution spectrale.	79

Chapitre III

Figure 1. Déroulement de l'expérimentation résumé en 5 étapes principales incluant les différentes mesures et traitements d'O ₃ .	87
Figure 2. Dispositif expérimental de fumigation des plantes avec l'ozone.	88
Figure 3. Chambre plante (à gauche), chambre de réaction des COV avec l'O ₃ connectée à la chambre plante (à droite) pour mesurer le dépôt d'O ₃ chimique.	88
Figure 4. Mesure de dépôt d'O ₃ chimique après application d'un stress mécanique sur la plante.	94
Figure 5. Changement des dépôts d'O ₃ chez Cervil et LA0147 en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O ₃ e.	97

LISTE DES FIGURES

Figure 6. Pourcentages de dépôt d'O ₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O ₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O ₃ chimique : ΦO_{3chim} par rapport au dépôt plante chez LA0147 et Cervil	97
Figure 7. Changement de conductance stomatique (gs) et de photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d'O ₃ chez LA0147 et Cervil.	98
Figure 8. Changement des dépôts d'O ₃ chez Castelmart et son mutant Odorless en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O _{3e} .	102
Figure 9. Pourcentage de dépôt d'O ₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O ₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O ₃ chimique : ΦO_{3chim} chez Castelmart et Odorless.	103
Figure 10. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation [O ₃] chez Castelmart et Odorless.	104
Figure 11. Emissions des COV des deux génotypes Castelmart et Odorless.	105
Figure 12. Pourcentage des émissions des différentes classes des COV émis au cours de l'exposition de Castelmart et Odorless à l'O ₃ .	106
Figure 13. Dépôt d'O ₃ chimique ΦO_{3chim} en application de stress mécanique pendant une fumigation des plantes avec 100 ppb d'O ₃ .	107
Figure 14. Changement des dépôts d'O ₃ chez Ailsa craig et son mutant GCR337 en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O _{3e} .	109
Figure 15. Pourcentage de dépôt d'O ₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O ₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O ₃ chimique : ΦO_{3chim} chez Ailsa craig et GCR337	110
Figure 16. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d'O ₃ chez Ailsa craig et GCR337.	111
Figure 17. Emissions des COV des deux génotypes Ailsa craig et son mutant GCR337.	112
Figure 18. Pourcentage des émissions des différentes classes de COV émis au cours de l'exposition de Ailsa craig et GCR337 à l'O ₃	114
Figure 19. Changement des dépôts d'O ₃ chez Maofen B02 et son mutant Maofen B02* en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O ₃ .	116
Figure 20. Pourcentage de dépôt d'O ₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O ₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O ₃ chimique : ΦO_{3chim} chez Maofen B02 et Maofen B02*.	117
Figure 21. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d'O ₃ chez Maofen B02 et Maofen B02*.	117
Figure 22. Emissions des COV des deux génotypes Maofen B02 et son mutant Maofen B02*.	119
Figure 23. Pourcentage des émissions des différentes classes des COV émis au cours de l'exposition de Maofen B02 et Maofen B02 à l'O ₃ .	120
Figure 24. Mesures SPAD, pourcentage de diminution de Fv/Fm et pourcentage de dommages visibles chez les parents et leurs mutants.	122
Figure 25. Teneur des COV stockés dans les feuilles des couples parents/mutants.	124
Figure 26. Relation entre le pourcentage de dommages visibles (%) et le LMA g m ² .	130
Figure 27. Relation entre le pourcentage des dégâts visibles et les émissions de LOX.	131

LISTE DES FIGURES

Figure 28. Relation entre les émissions d'hexanal et d'acide hexanoïque. Corrélation entre les émissions des LOX et les émissions des aldéhydes chez les 6 génotypes analysés.	132
Figure 29. Relation entre le pourcentage des dommages visibles et les émissions des acides gras.	134
Figure 30. Relations entre le pourcentage de diminution de F_v/F_m : et pourcentage de diminution de A et dommages visibles. Relation entre le dépôt O_3 plante : ΦO_3P et la photosynthèse A et conductance stomatique g_s .	135
Figure 31. Changement de la conductance stomatique (g_s) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d' O_3 chez les trois mutants.	136
Figure 32. Pourcentage de diminution de F_v/F_m et de formation des dommages visibles chez les 3 mutants.	137

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1. Coefficients de vitesse de phase gazeuse (k) de la réaction des terpènes avec l'O ₃ .	36
Tableau 2. Temps de résidence des COV fréquemment produits et émis par les plantes de tomate (sauf isoprène) en réaction avec l'O ₃ .	36
Tableau 3. Effet de l'ozone sur les émissions des COV.	38

Chapitre II

Tableau 1. Emissions de COV des parents et leurs mutants.	67
Tableau 2. Teneur des COV des parents sauvage et leurs mutants.	69
Tableau 3. Teneur en différents métabolites chez Castelmart et son mutant Odorless.	70
Tableau 4. Présence et absence des trichomes glandulaire et non glandulaire chez les génotypes analysés (parents sauvages et leurs mutants respectifs).	77

Chapitre III

Tableau 1. Concentrations d'O ₃ auxquelles LA0147 et Cervil étaient exposées au cours de l'expérimentation.	96
Tableau 2. Émissions des COV constitutifs et les teneurs extraites des surfaces des feuilles des parents sauvages et leurs mutants.	100
Tableau 3. Comparaison des densités de trichomes glandulaires (TG) et de trichomes non glandulaires (TNG) entre les parents et leurs mutants.	100
Tableau 4. Concentrations d'O ₃ auxquelles les parents et leurs mutants étaient exposées au cours de la fumigation aux 4 [O ₃] appliquées.	101
Tableau 5. Teneur des COV après l'exposition des parents sauvages et leurs mutants au stress oxydatif.	123

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les composés organiques volatils (COV) ont généralement deux origines, biogéniques et anthropiques. Ces derniers sont issus de toutes activités humaines (combustion, trafic routier et non routier, les différentes industries notamment pétrolières, l'industrie chimique, l'industrie agroalimentaire, le BTP, l'agriculture). Les COV d'origine anthropique les plus abondants sont certains alcanes et beaucoup de composés aromatiques tels que le benzène (C_6H_6), le toluène (C_7H_8), le xylène (C_6H_4). Les COV issus des sources biogéniques proviennent des surfaces marines, des surfaces terrestres, des animaux et principalement de la végétation, qui représente 80% à 98% des émissions biogéniques totales de COV émis dans l'atmosphère (Kettle et Andreae, 2000). Les végétaux produisent une grande quantité de composés dits secondaires, très diversifiés et qui jouent un rôle important dans la signalisation et l'adaptation à l'environnement (Jansen *et al.*, 2009, Niinemets *et al.*, 2012). Presque 100000 métabolites secondaires sont synthétisés dans le règne végétal et parmi ceux qui ont été caractérisés, 1700 sont des composés volatils (Dicke et Loreto, 2010). Les COV d'origine anthropique ou biogénique, désignent toute substance volatile autre que le méthane qui contient des atomes de carbone et un ou plusieurs autres éléments comme l'hydrogène, l'oxygène, des halogènes, le soufre ou le phosphore. Ces composés ont une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K (directive 1999/13/CE). D'un point de vue atmosphérique, l'isoprène est le COV le plus largement diffusé dans l'atmosphère et il représente près de 70% des COV totaux. Vient ensuite la classe des monoterpènes (11% des COV totaux) et des sesquiterpènes (2.5%) (Sindelarova *et al.*, 2014). Ces derniers jouent un rôle important dans l'atmosphère en raison de leur forte réactivité (Kanakidou *et al.*, 2005, Kammer, 2016). Grâce à leur pression de vapeur élevée et leurs structures lipophiles, les COV biogéniques peuvent facilement traverser les membranes cellulaires et être libérés dans l'atmosphère et dans le sol (Dudareva *et al.*, 2006).

1. Les différentes classes de COV biogéniques produits et émis par les plantes

Tous les organes des plantes produisent et émettent des COV vers l'atmosphère (tiges, feuilles, fleurs et fruits) ou dans le sol (racines) (Pichersky *et al.*, 2006). Il est estimé qu'environ 10% du carbone fixé par la photosynthèse retourne dans l'atmosphère sous forme de COV dans des conditions stressées (Peñuelas et Llusà, 2003).

Les COV sont classés principalement en fonction des voies de biosynthèse, de l'origine des émissions et des sites de biosynthèse.

INTRODUCTION GENERALE

1.1. Classification selon les voies de biosynthèse

Les COV émis par les plantes comprennent un groupe majoritaire d'isoprène et terpénoïdes (homo-, mono-, di-, sesquiterpénoïdes) et d'autres composés minoritaires comme les dérivés des acides gras et des acides aminés, les composés aromatiques phénylpropanoïdes ainsi que certains alcanes, alcènes, esters, aldéhydes, alcools et les cétones (Pichersky et Gershenzon, 2002, Holopainen, 2004) (figure 2).

1.1.1. Les isoprénoïdes

Ce groupe comprend au moins 40 000 composés (Tholl, 2015) généralement classés selon le nombre d'unités d'isoprène (McGarvey et Croteau, 1995). Cette diversité est due à la complexité des voies de biosynthèse (figure 2) (Bohlmann & Keeling, 2008). Ils sont produits par deux voies distinctes, la voie du mévalonate (MVA) et la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) (Degenhardt *et al.*, 2009, Lombard et Moreira, 2011). L'isopentenyl diphosphate (IDP) et le diméthylallyl diphosphate (DMADP) sont condensés par des prényltransférases résultant en de nombreux intermédiaires de longueurs de chaîne variables : le diphosphate de géranyle (GDP, pour la synthèse des monoterpènes C₁₀), le diphosphate de farnésyle (FDP, pour les sesquiterpènes C₁₅), le diphosphate de géranylgéranyle (GGDP, pour la synthèse des diterpènes C₂₀), et le squalène pour les tetraterpènes C₃₀) qui ne sont pas volatils (Rodríguez-Concepción, 2006, Pazouki *et al.*, 2016). Ces intermédiaires sont des substrats des terpènes synthases (TPS) qui sont spécifiques : les hémiterpènes synthases sont spécifiques de la formation des hémiterpènes, de l'isoprène et du 2-méthyl-buténol ; les monoterpènes synthases sont spécifiques des monoterpènes, les sesquiterpènes synthases des sesquiterpènes et les diterpènes synthases des diterpènes (Chen *et al.*, 2011, Pazouki et Niinemets, 2016). Les produits finaux dépendent principalement de la façon dont le carbocation du substrat est stabilisé sous l'action d'une enzyme donnée (Bohlmann et Keeling, 2008, Pazouki et Niinemets, 2016). Les monoterpènes tels que l' α - et β -pinène, δ -3-carène, α - et γ -terpinène, linalool, β -phellandrène et les sesquiterpènes tels que β -caryophyllène, α -humulène et β -coapène (figure 1) sont synthétisés dans les plastides, via le 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate plastidial / 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (MEP / DOXP) et dans le cytosol via la voie du mévalonate (MVA) respectivement. Les terpénoïdes peuvent être volatils, semi-volatils ou non-volatils, à chaîne droite ou à chaîne ramifiée, certains sont cycliques, d'autres sont acycliques. Ils diffèrent aussi par leur composition en groupes fonctionnels (ex. oxygénés pour les alcools, aldéhydes, cétones), et par leur solubilité ou insolubilité dans l'eau (Bohlmann et Keeling, 2008, Schwab *et al.*, 2008). Ces composés peuvent également être isomérisés et conjugués à d'autres squelettes, oxydés, méthylés ou acétylés, résultant en des dizaines de milliers de composés et dérivés.

INTRODUCTION GENERALE

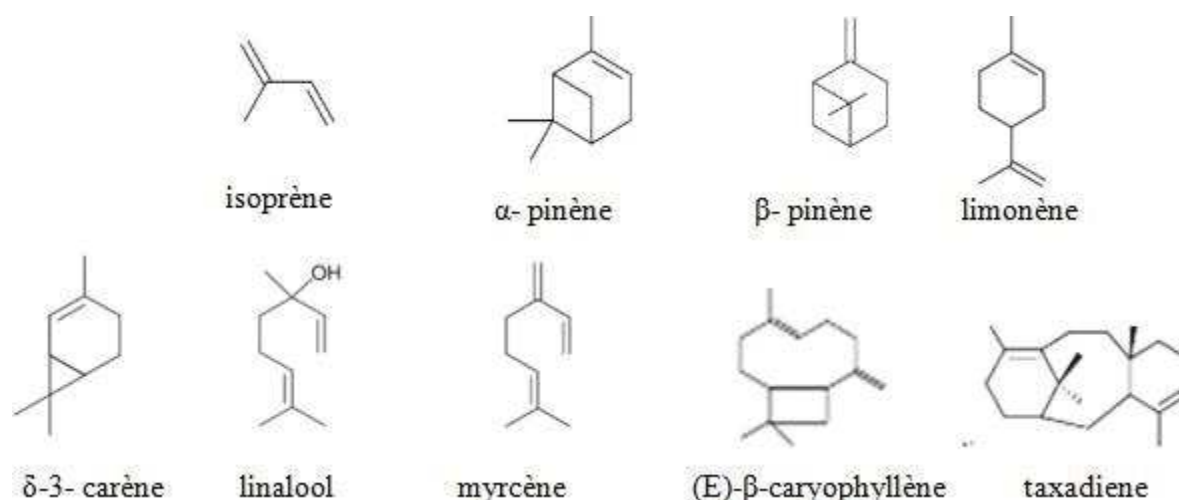


Figure 1. Structure de quelques COV isoprenoïdes.

1.1.2. Phénylpropanoïdes et benzénoïdes

Les phénylpropanoïdes et les benzénoïdes représentent la deuxième plus grande classe de COV végétaux (Knudsen *et al.*, 2006), synthétisés par la voie de l'acide shikimique via deux voies alternatives, la voie b-oxydante et/ou non b-oxydante (Maeda et Dudareva, 2012, Rambla *et al.*, 2014). Ces dérivés de la phénylalanine constituent une large gamme de composés volatils. Ils sont synthétisés sous l'action de la Phénylalanine Ammonia Liase (PAL). Parmi ces composés, on trouve les composés phénoliques et les flavonoides: méthyl salicylate et eugénol, l'acide chlorogénique, rutine et kaempferol.

1.1.3. COV d'autres origines métaboliques

Les végétaux émettent également divers COV oxygénés (COVO), par exemple le méthanol, l'éthanol, le méthylbutanol, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde ou l'acétone (Fall, 1999). Ces composés sont peu étudiés car on considère qu'ils impactent peu la chimie atmosphérique. Les COVO sont principalement des produits cataboliques de la dénaturation des parois et membranes cellulaires (Loreto et Schmitter, 2010).

Le méthanol est l'unique composé oxygéné à courte chaîne, dont la source d'émission principale est biogénique. Jacob *et al.* (2005) ont estimé que les écosystèmes terrestres (biotiques et abiotiques) dominent les émissions mondiales de méthanol avec 78% de la production annuelle mondiale, le reste provenant de l'oxydation atmosphérique des COV (15%), de la combustion de la biomasse (5%) et des zones urbaines (2%). Les COV contenant de l'azote et du soufre sont dérivés du métabolisme

INTRODUCTION GENERALE

des acides aminés. L'indole, le membre le plus répandu de ces groupes est formé par clivage direct du précurseur du tryptophane, l'indole-3-glycérol phosphate (Frey *et al.*, 2000).

1.1.4. Composés de surface des feuilles

La surface des feuilles est recouverte d'un matériau cireux qui se compose d'hydrocarbures à longues chaînes. Les acides, les alcools et les esters sont les composants dominants de ces cires, mais il existe d'autres composés avec un poids moléculaire élevé et une faible volatilité, bien qu'une petite fraction peut se volatiliser en particulier à températures élevées.

1.1.5. Composés de stress et dérivés d'acides gras

Ces COV comprennent des substances émises à des niveaux relativement faibles dans des conditions non stressées, mais ils peuvent représenter plus de 50% des émissions des plantes stressées (Holopainen, 2004). Ils regroupent l'éthène, les terpénoïdes, les benzénoïdes, les aldéhydes et les volatils des feuilles vertes (GLV) qui sont dérivés des acides gras insaturés comme l'acide linoléique ou l'acide linolénique. Ils se forment par clivage (fracture) oxydant des acides gras C₁₈, en présence d'oxygène et d'enzymes, telles que les lipoxygénases de type 2 (13-LOX) qui catalysent l'oxygénation de l'acide α -linolénique. Cette action résulte de la formation de l'acide 13-hydroperoxy linolénique (HPLA), la dégradation de ce dernier provoquant la formation des oxylipines volatiles. Parmi ces composés on trouve l'hexanol, l'acide hexanoïque, l'hexanal, les alkanals (ex. propanal, butanal, pentanal, furanes et furanones (ex. tétrahydrofuran, 2-éthyl furan) (Matsui *et al.*, 2010).

INTRODUCTION GENERALE

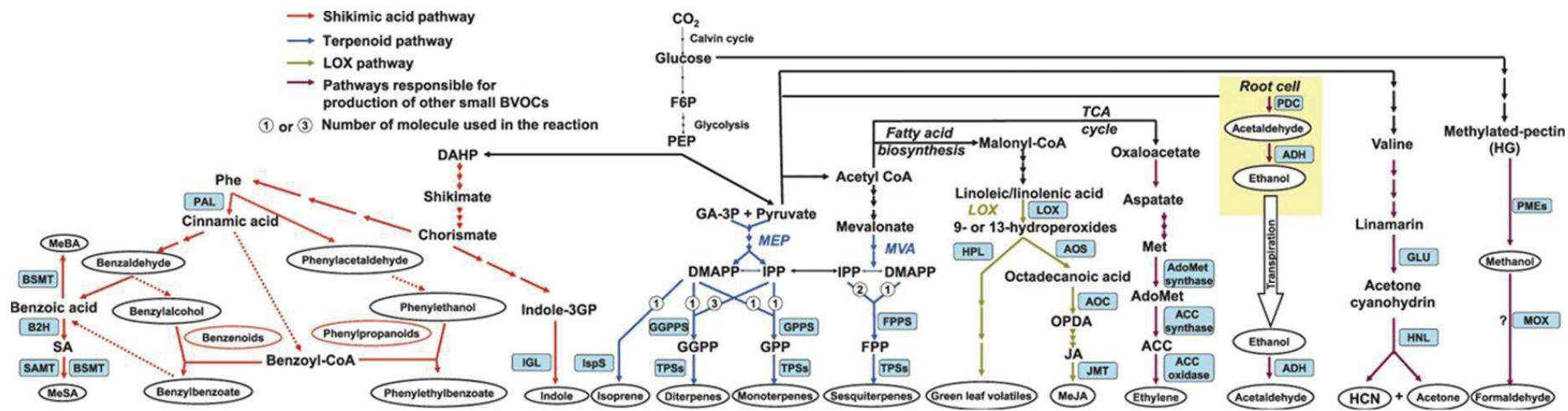


Figure 2. Description simplifiée des voies métaboliques de la biosynthèse des COV. Ces derniers sont représentés dans des zones de forme ovale, les formes cadrées représentent les enzymes responsables de leur synthèse (adapté de Dudareva et al., 2006). Abréviation en anglais : ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ADH, alcohol dehydrogenase; AdoMet, S-adenosyl-L-methionine; ALDH, aldehydedehydrogenase; AOC, allene oxide cyclase; AOS, allene oxide synthase; B2H, benzoic acid-2-hydroxylase; BSMT, S-adenosyl- L- methionine:benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase; CoA, coenzyme A; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; FPP, farnesyl diphosphate; FPPS, FPP synthase; F6P, fructose-6-phosphate; GA-3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; GGPPS, GGPP synthase; GLU, β -glucosidase; GPP, geranyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; HCN, hydrogen cyanide; HG, homogalacturonic acid; HNL, hydroxynitrile lyase; HPL, fatty acid hydroperoxide lyase; IGL, indole-3GP lyase; indole- 3GP, indole 3-glycerol phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; IspS, isoprene synthase; JA, jasmonic acid; JMT, jasmonic acid carboxyl methyltransferase; LOX, lipoxygenase; MeBA, methyl benzoate; MeJA, methyl jasmonate; MEP, 2-C-methyl- D-erythritol 4-phosphate; MeSA, methyl salicylate; Met, methionine; MOX, methanol oxidase; MVA, mevalonate; OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid; PAL, phenylalanine ammonia lyase; PDC, pyruvate decarboxylase; PEP, phosphoenolpyruvate; Phe, phenylalanine; PMEs, wall-localized pectin methylesterases; SA, salicylic acid; SAMT, S-adenosyl- L- methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase; TCA, tricarboxylic acid or citric acid; TPSs, terpene synthases (Peñuelas et Lusià, 2003).

INTRODUCTION GENERALE

1.2. Classification selon la source d'émission (constitutive ou induite)

Les COV peuvent être émis de manière constitutive ou induite. Dans le premier cas, les COV sont présents naturellement dans les plantes en absence de stress (Holopainen, 2011, Holopainen et Blande, 2012) et peuvent être libérées à tout moment, ce qui en fait des marqueurs possibles de la variabilité génotypique. A l'inverse, les COV induits sont produits/émis sporadiquement après l'exposition de la plante (ou une partie de la plante, feuille, tige, racines ou fruit) à un stress abiotique tels que le stress hydrique, thermique, lumineux ou l'exposition à l'ozone (Arimura *et al.*, 2005, Staudt et Bertin, 1998), à un stress biotique tels que les attaques de pathogènes et d'herbivores (Cardoza *et al.*, 2002, Loreto et Schnitzler, 2010) ou à une combinaison de stress multiples. Cependant, la dissociation entre les émissions constitutives et induites reste difficile.

1.3. Classification selon le site de biosynthèse (Stockage ou synthèse *de novo*)

Les émissions constitutives ou induites peuvent provenir d'un stockage au sein de structures spécialisées dans la plante, tels que les canaux résinifères chez les conifères (Bernard-Degan, 1988) ou les trichomes chez la tomate (Jansen *et al.*, 2009). Les structures de stockage, trichomes sont détaillées dans la partie 5. Le taux d'émission des COV dépend de la distance parcourue par les COV depuis leur lieu de stockage vers l'atmosphère, (transport) et des propriétés physicochimiques des membranes d'autre part (Tissier *et al.*, 2017). Hormis ceux qui sont stockés, les COV peuvent être formés *de novo* dans le cytosol ou les plastides, traverser les membranes et diffuser directement à l'extérieur de la cellule végétale et de la cuticule vers l'atmosphère. Il a été proposé que dans ce cas le taux de diffusion est égal au taux de synthèse (sauf perte pendant le transfert) (Niinemets *et al.*, 2010).

2. Les facteurs influençant l'émission des COV par les plantes

2.1. Les effets à court-terme de la température, de la lumière et du CO₂

Les émissions des COV dépendent des facteurs environnementaux notamment, la température. La synthèse des monoterpènes évolue positivement avec l'augmentation de la température dû aux effets positifs de la température sur l'activité des monoterpènes synthases (Grote *et al.*, 2006, Niinemets, 2010) (figure 3). L'émission d'isoprène s'augmente généralement avec la température jusqu'à une température seuil (figure 3) (Velikova et Loreto, 2005). Les émissions des COV augmentent également avec l'intensité lumineuse (Loreto et Sharkey, 1990). Cette augmentation pourrait être liée à la disponibilité accrue du substrat lorsque la photosynthèse est stimulée, ou une activation accrue de l'isoprène synthase (Silver et Fall, 1991). En outre, de nombreuses études sur différentes espèces

INTRODUCTION GENERALE

végétales ont montré une inhibition de la biosynthèse de l'isoprène sous enrichissement en CO₂ (Sharkey *et al.*,1991). Les polluants atmosphériques tels que l'ozone troposphérique stimule également les émissions des COV (ce point est détaillé dans la partie 9).

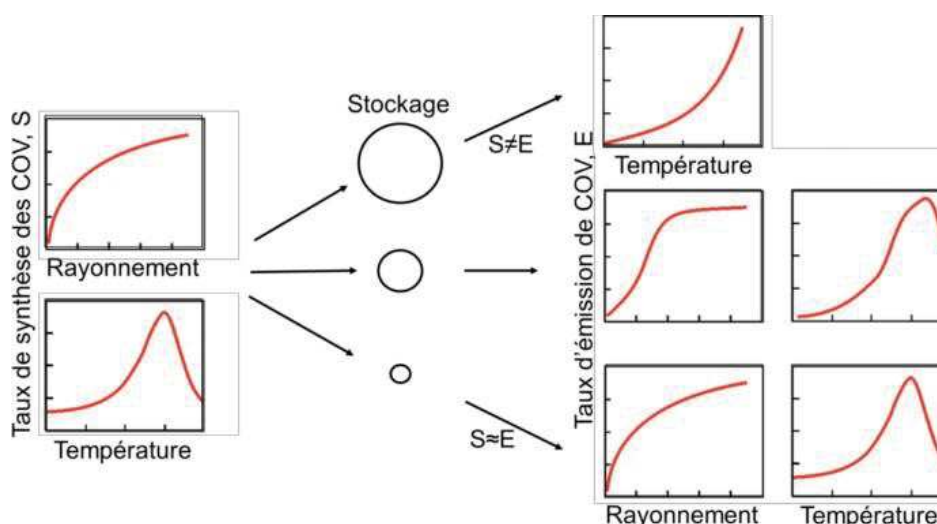


Figure 3. Représentation schématique de l'influence du rayonnement et de la température sur le taux de synthèse des COV (S), et leur taux d'émission (E). Pour les espèces dont les réservoirs de stockage sont importants, l'émission de COV dépend de la résistance du réservoir de stockage à la diffusion des COV (gouvernée par la température). Dans ce cas, l'émission de COV est indépendante du rayonnement solaire et les émissions ne dépendent pas directement du taux de synthèse ($S \neq E$). Cependant, les émissions de COV non stockés (par exemple l'isoprène) dépendent directement du taux de synthèse ($S \approx E$) (d'après Laothawornkitkul *et al.*, 2009, Kammer, 2016).

2.2. Les effets à long terme de la disponibilité en eau et en nutriments et des stress biotiques

Sharkey et Loreto. (1993) rapportent que chez Kudzu, les émissions d'isoprène représentent de $0,2 \pm 0,02$ % du carbone fixé par la photosynthèse avant le stress hydrique à $14 \pm 8\%$ après le stress. La biosynthèse des COV pourrait être limitée par le manque de nutriments spécifiques (par exemple le fer, le soufre, le manganèse ou le phosphore utilisés comme intermédiaires. Ibrahim *et al.* (2008) rapportent que les sols pauvres en éléments nutritifs entraînent des baisses substantielles des émissions de COV induites par les herbivores. La flore microbienne et les stress biotiques ont des effets sur la production et les émissions des COV. Des augmentations des émissions de certains COV tels que β -Ocimène et Copaène ont été signalées dans des plantes de tomates infectés par *Botrytis cinerea* (Kasal-Slavik *et al.*, 2017) et du méthyle Salicylate dans les infestations de pucerons sur le bouleau verruqueux (Blande *et al.*,2010).

INTRODUCTION GENERALE

3. Processus de stockage et d'émissions des COV au niveau de la plante

La composition et la quantité des COV produits et émis diffèrent entre les espèces et les génotypes, et dépendent de la taille, de la structure et de l'âge des organes (Niinemets *et al.*, 2010). Les émissions dépendent à la fois de la capacité des plantes à synthétiser des COV (fonction de la disponibilité des substrats et des enzymes) et de leur aptitude à stocker ou non ces composés, ce qui est lié à la présence ou absence de structures de stockage.

Chez les plantes sécrétrices, on suggère que la diffusion des COV vers l'extérieur (atmosphère) est réalisée à partir des structures de stockage comme les trichomes dont la morphologie et la composition pourraient favoriser ou limiter la diffusion. La diffusion des COV à travers la cuticule dépend du poids moléculaire des substances, de leur concentration dans les tissus végétaux et principalement de la pression de vapeur de ces composés dans la feuille. Ce processus de diffusion est plus lent que l'émission par voie stomatique (Guenther *et al.*, 2000). Il a été démontré que plusieurs COV (isoprène et quelques monoterpènes) passent par les stomates et que ces derniers ne limitent pas le flux d'émission à condition que l'accumulation du volatil ne limite pas sa propre vitesse de synthèse (Niinemets et Reichstein., 2003). En effet a été démontré que les taux d'émission d'isoprène (Fall et Monson, 1992) et de monoterpènes (Loreto *et al.*, 1996) sont indépendants de la conductance stomatique. Cependant pour les isoprénoïdes oxygénés, les acides organiques ou le méthanol, la conductance stomatique pourrait avoir un petit effet sur les émissions (Niinemets *et al.*, 2014).

4. Rôles éco-physiologiques des COV

4.1. Participation à la reproduction des plantes

Beaucoup de COV floraux tels que le linalool sont essentiels pour la reproduction des plantes en attirant les pollinisateurs (Raguso, 2016). Après la pollinisation, les COV à travers l'odeur des fruits peut aider à attirer les disperseurs des graines et leur permettre de localiser et de différencier la maturation des fruits (Luft *et al.*, 2003). Ces substances jouent donc un rôle à toutes les étapes de la reproduction des plantes. Terry *et al.* (1995) ont rapporté que l'exposition des plantes de l'orge, du colza et d'*Arabidopsis* à l'isoprène favorise leur floraison.

INTRODUCTION GENERALE

4.2. Défense contre le stress biotique

4.2.1. Action de défense directe

Certains COV tels que le sesquiterpènes (E)- β -caryophyllène, le monoterpènes β -phellandrène (Raghava *et al.*, 2010), le méthyl salicylate et les green volatils (C_6) libérés par les organes végétatifs de la plante peuvent les protéger des agents pathogènes par leur activité antimicrobienne ou antifongique (Shiojiri *et al.*, 2006, Alfaro *et al.*, 2002). Ils peuvent aussi affecter la physiologie et le comportement des herbivores par leurs propriétés toxiques (Aharoni *et al.*, 2003). Corrado *et al.* (2007) ont montré que chez la tomate, les émissions de α -pinène, β -myrcène, 3-carène, limonène et β -ocimène attirent la guêpe parasitoïde *Aphidius evri*. Kang *et al.* (2010) ont montré qu'un mutant de tomate déficient en monoterpènes et sesquiterpènes constitutifs était sensible aux attaques des herbivores par rapport à un génotype de tomate qui contient des niveaux normaux de ces composés.

4.2.2. Action indirecte

Les COV servent aussi dans la communication chimique entre les différents organes et tissus de la plante, entre les plantes et les insectes et entre les plantes voisines. Cette communication peut activer directement les mécanismes de défense par attraction des prédateurs pour une défense précoce (Arimura *et al.*, 2000). Au niveau racinaire, les COV peuvent participer à la défense contre les organismes qui colonisent la rhizosphère (Bonfante et Genre, 2010). Il a été montré que les racines des plantes de maïs synthétisent (E)- β -caryophyllène, et qu'en cas de stress, ce composé peut attirer les nématodes entomo-pathogènes pour défendre la plante (Turlings *et al.*, 2012). Dans les racines d'*Arabidopsis*, le diterpène rhizathalène est considéré comme défenseur chimique constitutif (Vaughan *et al.*, 2013). Certains terpenoïdes peuvent aussi agir comme des oxydants ou des phytotoxiques pour les racines et inhiber la flore microbienne utile pour les plantes (Jassbi *et al.*, 2010) ou stimuler la croissance des plantes parasites (Rasman *et al.*, 2012). Les COV peuvent être aussi considérés comme une source de carbone : il a été montré que les rhizobactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* métabolisent l' α -pinène comme unique source de carbone (Kleinheinz *et al.*, 1999). En ce qui concerne la relation entre la partie aérienne et la partie souterraine de la plante, au sein des solanacées, il a été rapporté que des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les composés phénoliques sont synthétisés dans les racines et transportés dans les feuilles, ces composés pourraient être volatiles ou des précurseurs de volatils émis ensuite par les feuilles (Sangwan *et al.*, 2008, Senthil *et al.*, 2009). En cas de stress les signaux chimiques peuvent donc être échangés entre les deux parties de la plante (Champagne *et al.*, 2016). C'est le cas des alcaloïdes comme la nicotine qui sont formés dans les racines et ensuite exportés vers les feuilles, y compris leurs

INTRODUCTION GENERALE

trichomes. Par exemple, l'infestation des feuilles de maïs par les insectes herbivores provoque des changements dans le mélange des émissions des racines (Delory *et al.*, 2016). Duan *et al.* (2019) ont rapporté que le transport interne des terpénoïdes par les plantes existe dans les conifères, et que les terpénoïdes sont transportés dans la sève de xylème. A la lumière de ces études, on suggère que les terpénoïdes peuvent être transportés des racines aux feuilles ou vice versa et on suppose que l'échange et la relation entre les émissions des plantes des parties aériennes et souterraines n'est pas exclue.

4.3. Implication dans la réponse aux stress abiotiques

Plusieurs études ont proposé que l'isoprène peut protéger l'appareil photosynthétique des plantes des dommages causés par les hausses de température (Singsaas *et al.*, 1997, Behnke *et al.*, 2007), et par la lumière excessive avec les mécanismes de dissipation de l'énergie ou la minimisation de la formation des ROS (Reactive oxygen species, en anglais, les espèces réactives à l'oxygène). En outre, les COV pourraient être des agents antioxydants en cas de stress oxydatif liés à l'ozone (Fares *et al.*, 2011) (figure 4).

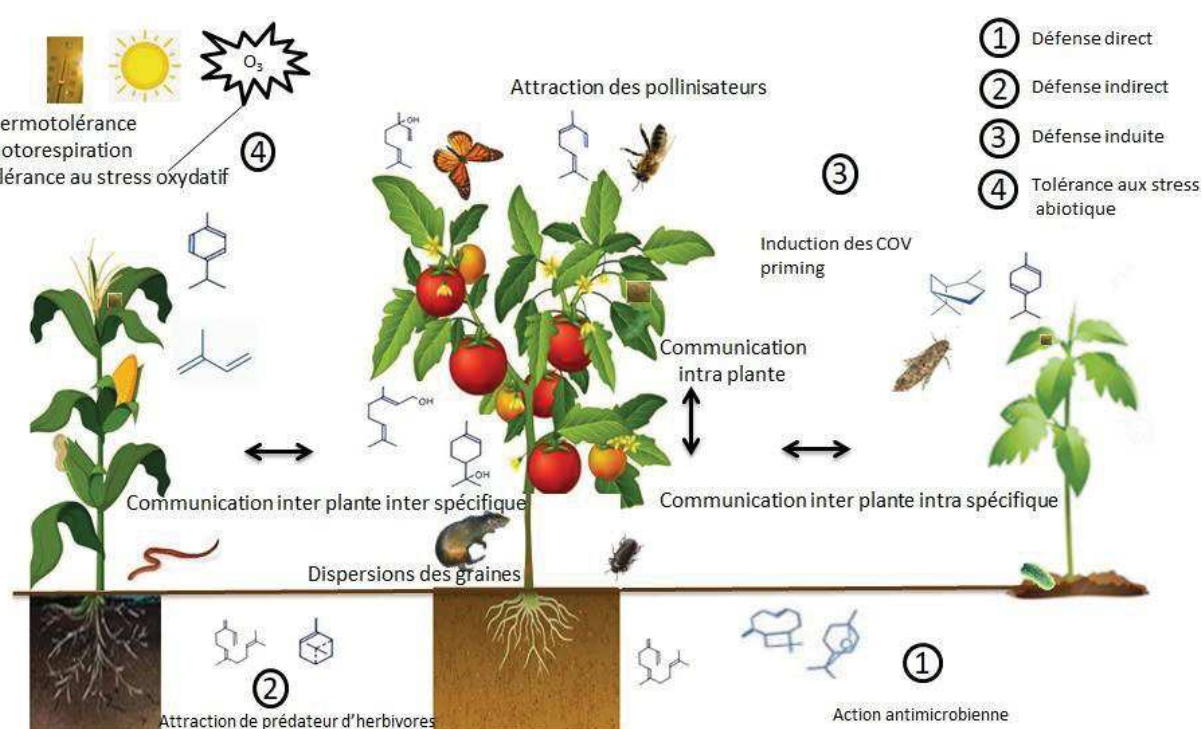


Figure 4. Rôle éco-physiologique des COV émis par les parties aériennes et souterraines des plantes (modifié d'après Fantaye *et al.*, 2014 et Dudareva *et al.*, 2006).

INTRODUCTION GENERALE

5. Structures de stockage des COV : trichomes

Chez certaines plantes sécrétrices, les COV sont stockés dans des structures spécialisées appelées trichomes glandulaires qui sont observés à la surface d'environ 30% des plantes vasculaires (Glas *et al.*, 2012). Ces trichomes diffèrent entre les espèces et génotypes et ont un rôle important dans l'adaptation de la plante à son environnement. Presque tous les organes végétatifs portent ces poils (feuilles, tige, racine et fleurs) dont les types, la morphologie, la densité et la composition varient également. En général, il existe huit types de trichomes. Selon Luckwill, (1943) et Channarayappa *et al.* (1992) chez la tomate *Lycopersicon esculumtum* qui est considérée comme un modèle pour l'étude des trichomes, ils sont classés en trichomes glandulaires qui incluent les trichomes de type I, IV, VI et VII et en trichomes non glandulaires qui comprennent les trichomes de type II, III et V et VIII (figure 5). Kim *et al.* (2012) ont proposé que le cout de construction est plus élevé pour les trichomes glandulaires à cause de leur production et le stockage en métabolites secondaires.

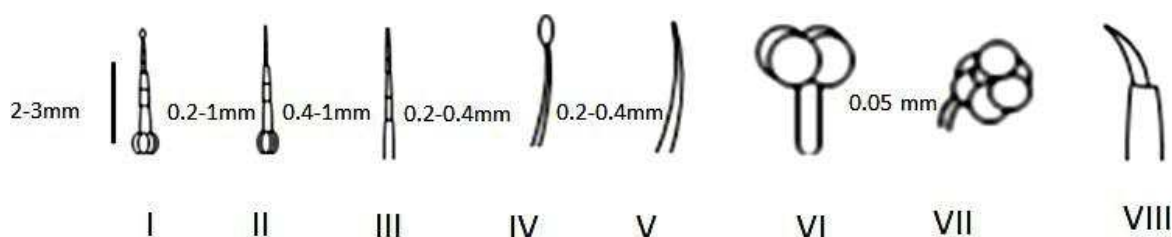


Figure 5. Morphologie et longueur des 8 types de trichomes chez la tomate (décrit par Luckwill, 1943 et révisé par Channarayappa *et al.*, 1992). La longueur de type VI et VIII n'a pas été décrite.

Les trichomes non glandulaires n'ont pas de structures sécrétoires ; ils sont protégés par une couche de cire qui contient des hydrocarbures saturés oxygénés et non oxygénés à longue chaîne (Corsi et Bottega, 1999).

Les trichomes glandulaires produisent et stockent divers métabolites secondaires qui peuvent être volatils, semi-volatils ou non volatils ; les substances les plus stockées sont principalement les terpénoïdes mais aussi, les phénylpropénoïdes, les flavonoïdes, les méthylcétones, les sucres acyliques et les protéines défensives (Schilmiller *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2012). Les métabolites produits par les trichomes glandulaires peuvent présenter jusqu'au 15 à 20% du poids sec des feuilles (Wagner *et al.*, 2004).

Les trichomes glandulaires sont de deux types: peltate et capitate qui sont structurellement différents.

INTRODUCTION GENERALE

Les Trichomes peltés se composent d'une cellule basale, d'une courte tige et d'une tête comprenant de nombreuses cellules sécrétoires, qui s'élève au-dessus d'une grande cavité de stockage sous-cuticulaire (figure 6). Tissier *et al.* (2017) rapportent que les trichomes de type VI (peltés) de la tomate stockent des composés dans la cavité intercellulaire entre les cellules de sécrétion. Les auteurs suggèrent que cette cavité de stockage est produite par le fractionnement de la cuticule et la paroi cellulaire des cellules sécrétoires résultent des trichomes en forme d'ampoule (Turner *et al.*, 2000). La cuticule de ce type de trichomes est dépourvue de composés. Ce mécanisme de répartition des composés est développé par la plante pour son auto protection contre des substances toxiques pour la plante elle-même en cas de synthèse ou stockage à fortes concentrations (Turner *et al.*, 2000).

Les trichomes capités sont constitués d'une ou plusieurs cellules basales, d'une à plusieurs cellules pédonculées et d'une ou de quelques cellules sécrétoires à l'extrémité de la tige (Maffei *et al.*, 2010) (figure 6). Ces trichomes produisent principalement de l'acyl glucose, des sucres acylés non volatils (Maffei *et al.*, 2010) ou des composés non- et semi-volatils tels que les diterpènes qui sont directement sécrétés à l'extrémité du trichome et exsudent à sa surface (Tissier *et al.*, 2012), dans une partie de la tige et aussi à la base du trichome (cela dépend de l'espèce et de génotype).

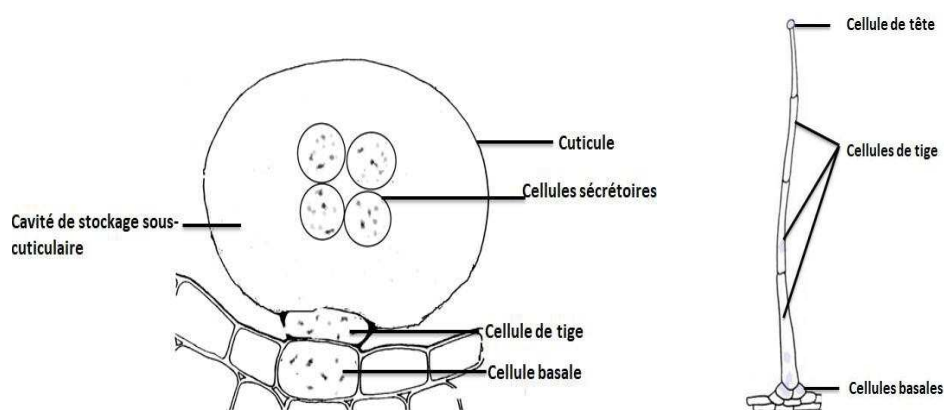


Figure 6. Morphologie détaillée des deux trichomes glandulaires les plus abondants : capité type I (à droite) et pelté type VI (à gauche), modifier d'après Turner *et al.*, 2000 et Kim *et al.*, 2012 respectivement.

Les trichomes branchés ont été remarqués sur les plantes d'*Arabidopsis* et sur *Artemisia annua*. Ils sont unicellulaires, ramifiés avec deux à cinq branches (Mathur, 2000).

Les trichomes non glandulaires et glandulaires ont des rôles différents. Les trichomes non glandulaires servent principalement de barrières mécaniques à la surface des feuilles. Ils peuvent être impliqués dans la protection contre les insectes herbivores et les champignons en empêchant ou

INTRODUCTION GENERALE

perturbant leurs mouvements sur les feuilles. Ils peuvent aussi avoir un rôle protecteur contre les UV par couverture de la couche épidermique et pourraient également affecter la transpiration de la plante en limitant la diffusion de l'eau (Karabourniotis *et al.*, 1992, 1993). Les trichomes glandulaires sont des structures sécrétoires protégeant potentiellement les feuilles contre divers stress via la sécrétion et le stockage de composés de défense, tels que les terpénoïdes (Biswas *et al.*, 2009). Ils peuvent accumuler de grandes quantités d'huiles essentielles et ont été associés à la résistance contre des insectes ravageur (Biswas *et al.*, 2009). Ils participent également à la réduction de la perte d'eau et à la filtration des rayons UV (Biswas *et al.*, 2009). Certaines plantes peuvent tolérer des niveaux élevés de métaux, grâce à des protéines défensives riches en cystéine (Liu *et al.*, 2015) sécrétées dans les trichomes glandulaires, comme le montre le tabac tolérant au cadmium et au zinc via ses trichomes (Sarret *et al.*, 2006). Les trichomes glandulaires peuvent également sécréter des ions salins, conduisant à l'équilibration au calcium dans la plante (De Silva *et al.*, 2001).

6. COV et la chimie atmosphérique

Les COV sont impliqués dans les relations entre l'atmosphère et la biosphère (Levis *et al.*, 2003). Les COV (biogéniques et certains COV anthropiques) étant très réactifs, une fois libérés dans l'atmosphère, ils peuvent être transformés et oxydés (figure 7). Bergström *et al.* (2014) estiment que les émissions des COV induits en réponse au stress environnementaux sont la source de 50 à 70% des aérosols secondaires. En plus, leur oxydation peut affecter le pouvoir oxydatif de la troposphère et donc influencer le temps de vie d'autres gaz tels que le méthane et l'ozone (O_3) et en conséquence leur concentrations et distances de transport dans l'atmosphère (Wayne, 2000). La dégradation des COV dans l'atmosphère sous l'effet du rayonnement solaire et de la chaleur affecte l'accumulation des gaz à effet de serre et des polluants atmosphériques photochimiques tels que l' O_3 . Ils peuvent donc avoir un impact sur l'environnement, la biodiversité et la santé humaine.

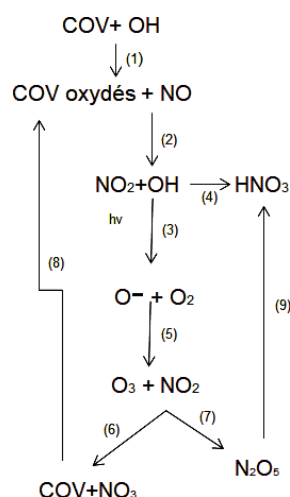


Figure 7. Réactions troposphériques de formation de certains polluants secondaires. En commençant par l'oxydation des COV et la formation de NO₂, plusieurs réactions s'ensuivent pour former plusieurs composés. (1) Les COV sont oxydés par les radicaux OH. (2) Les COV oxydés peuvent être réduits par le NO pour former du NO₂, et la voie supplémentaire du COV régénère souvent OH. (3) Sous l'influence de la lumière, le NO₂ se fragmente en NO + O⁻. (4) NO₂ peut également réagir avec OH pour former HNO₃. (5) O⁻ + O₂ forme O₃. (6) Si suffisamment d'O₃ et de NO₂ sont présents, ils peuvent alors réagir pour former NO₃ ou (7) N₂O₅. (8) Le NO₃ peut oxyder les COV et ainsi compléter un cycle. (9) Le N₂O₅ peut former du HNO₃ au contact de surfaces humides contenant de petites particules atmosphériques (Renaut *et al.*, 2009).

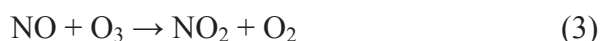
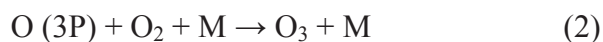
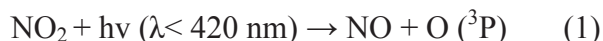
7. Formation de l'ozone

Dans l'atmosphère, il existe deux types d'O₃. La couche d'O₃ dans la stratosphère (la partie supérieure de l'atmosphère, située entre 15 et 40 km d'altitude environ), qui absorbe les rayonnements UV nocifs, cette couche est bénéfique. À l'opposé, dans la troposphère (la partie inférieure de l'atmosphère, approximativement à 10-12 km d'altitude), l'O₃ est nuisible et considéré comme un polluant (Heath, 2008).

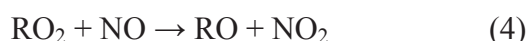
La présence d'O₃ dans la troposphère est due à la descente nette d'O₃ par diffusion tourbillonnaire à partir de la stratosphère et à l'interaction des COV, des oxydes d'azote (NO_x) et de la lumière (Roelofs et Lelieveld, 1997). Les COV émis contribuent à la formation de l'O₃ troposphérique en réaction avec les NO_x et en présence de rayonnement solaire. Il a été rapporté que les COV biogéniques participent à environ 10% de l'O₃ formé par photo oxydation, tandis que, les COV d'origine anthropique participent à environ 40% (Sartelet *et al.*, 2012).

INTRODUCTION GENERALE

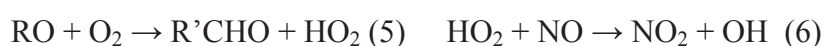
L'O₃ est formé par la photolyse de NO₂ selon le mécanisme suivant (Finlayson-Pitts *et al.*, 2000) (figure 8) :



M est un troisième corps qui permet d'absorber l'excès d'énergie apportée par la collision entre l'atome d'oxygène et O₂ (Seinfeld et Pandis, 2006). La photolyse de NO₂ induit la formation d'une molécule de NO et d'un atome d'oxygène O (1) qui réagit rapidement avec le dioxygène O₂ pour aboutir à la formation d'O₃ (2). L'O₃ réagit alors rapidement avec NO, pour reformer NO₂ (3). Par l'oxydation des COV, les radicaux alkyles, se convertissent en radicaux peroxy RO₂ (figure 9). Ces derniers réagissent également avec NO pour former par oxydation NO₂ et le radical RO (4).



RO₂, réagit avec NO (à l'exception des régions pauvres en NO_x où RO₂ peut réagir avec lui-même et avec d'autres radicaux peroxy). En cas de fortes concentrations de NO_x, le radical RO formé (3) réagit avec l'O₂ et produit (5) :



Toutefois, les quantités d'O₃ produites dépendent de la présence des NO_x et du taux de transformation de NO en NO₂ par les radicaux RO₂ et HO₂ formés lors de l'oxydation des COV (Coates et Butler, 2015). En outre, la réaction des COV avec NO_x sous la lumière ne produit pas que l'O₃ mais d'autres composés oxydants tels que les aldéhydes et les cétones (7) selon le bilan (Finlayson-Pitts *et al.*, 2000) :



La formation de l'O₃ est fortement liée aux concentrations des COV et de NO_x. Dans le cas où les concentrations de NO_x sont plus élevées que celles des COV, la réaction principale est (8):



INTRODUCTION GENERALE

Cependant, la réaction $\text{OH} + \text{RH} \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}$ (8) peut rentrer en compétition avec la réaction (7) et contribuer dans la formation d' O_3 .

Dans le cas où les concentrations des COV sont plus élevées que celles de NO_x , Deux réactions pourraient se produire (9,10):

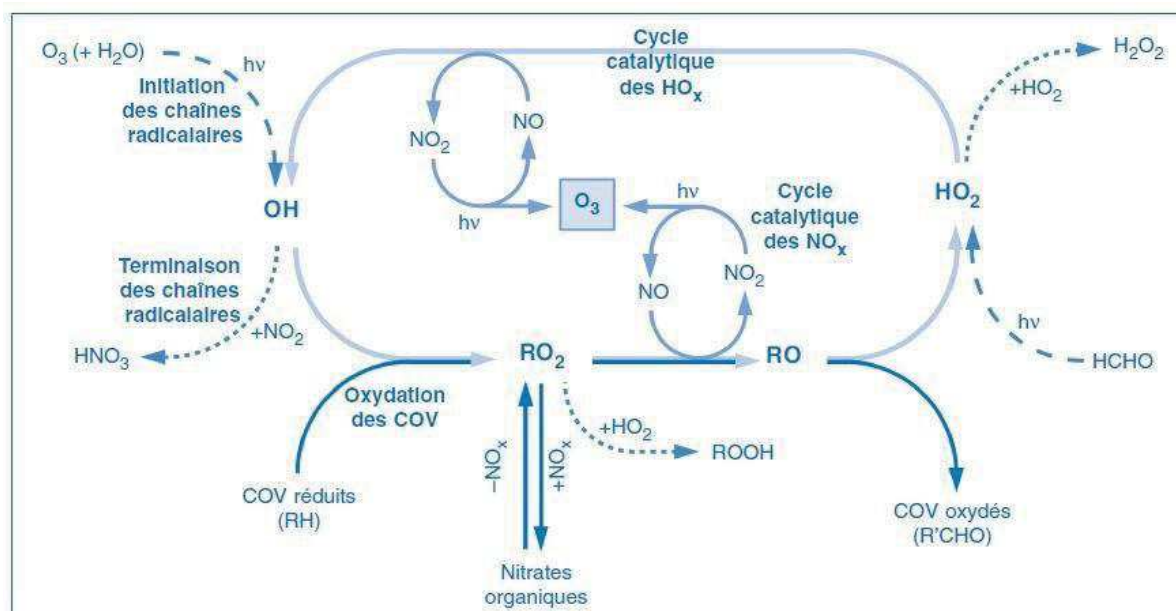
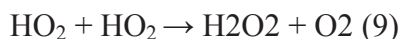


Figure 8. Cycle de formation de l' O_3 troposphérique (Camredon et Aumont, 2007).

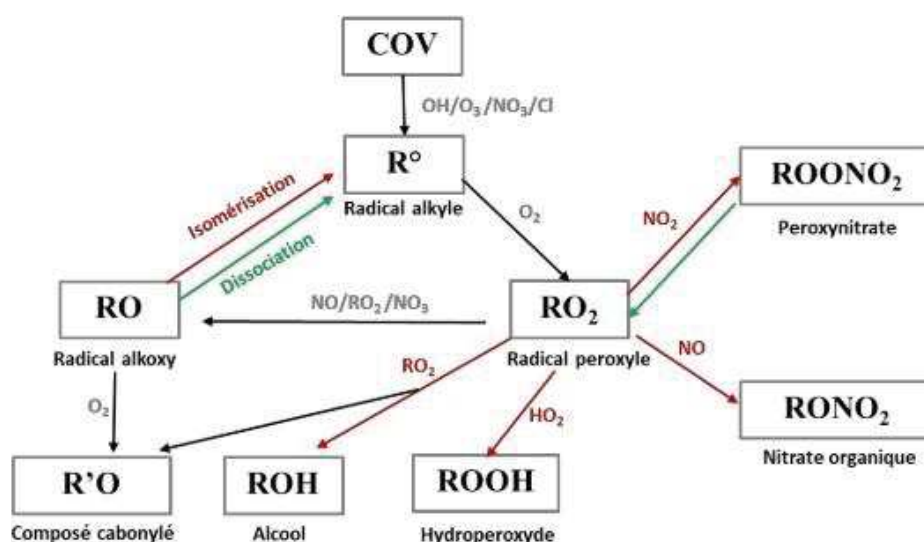


Figure 9. Mécanisme simplifié de la photo-oxydation atmosphérique des COV. Flèches rouge et verte indiquent les processus de l'isomérisation et la dissociation respectivement (Kroll et Seinfeld, 2008, Kalalian, 2018).

INTRODUCTION GENERALE

Il a été rapporté qu'en Europe, le stress causé par l'O₃ pendant une saison de croissance peut diminuer de 25 % la productivité du blé et de la pomme de terre (Pleijel *et al.*, 2007, Bagard, 2018). A cause de son pouvoir oxydant, l'O₃ affecte les processus métaboliques de la plante, ce qui entraîne une réduction de l'assimilation du carbone, et de la conductance stomatique due à une réduction de l'activité et de la quantité de la rubisco et à la dégradation de la chlorophylle. Il conduit ainsi à des dommages sur les feuilles (figure 10) (Ashmore, 2005). L'O₃ pourrait réduire le taux de germination des graines et altérer le développement floral (Black *et al.*, 2000). En outre, l'exposition à l'O₃ altère également la qualité des divers produits agricoles: il peut causer une altération de la qualité des fibres de coton du tubercule, de pomme de terre et de la pastèque ou provoquer la diminution de la teneur en huile, en protéines et en glucides dans les graines de colza (Black *et al.*, 2000).

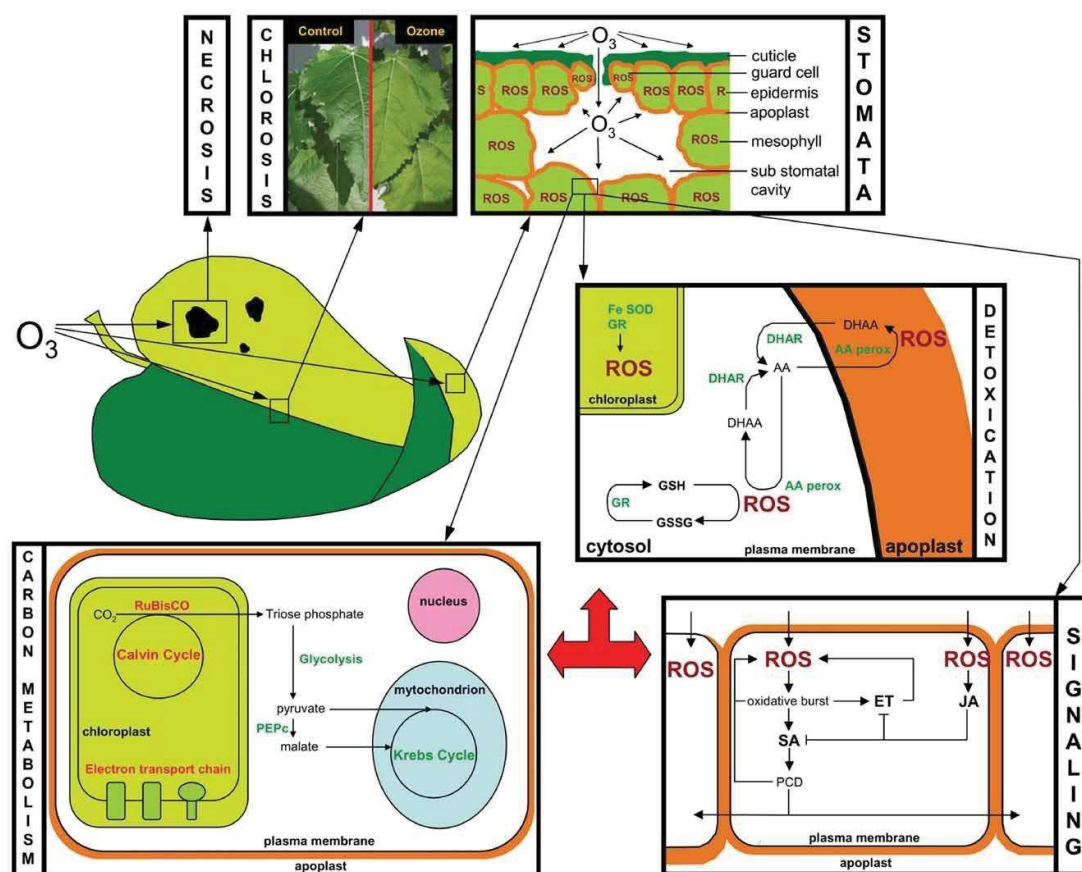


Figure 10. Les volets les plus importants des effets de l'O₃ sur les feuilles des plantes:

Des lésions visibles, la nécrose et de la chlorose; les stomates, la diffusion de l'ozone dans les feuilles via les stomates et génération des ROS; la désintoxication, d'O₃ dans l'apoplaste et cytosol; signalisation, l'O₃ active les voies de signalisation éthylène / acide salicylique et jasmonate qui conduisent à des réponses différentes, la voie de l'acide jasmonique peut inhiber les voies de l'éthylène et de l'acide salicylique; le métabolisme du carbone, la photosynthèse est généralement réduite lors de l'exposition aux niveaux photochimique et biochimique, tandis que la respiration est

INTRODUCTION GENERALE

augmentée, y compris la voie anaplérotique qui implique la PEPc. AA: acide ascorbique, AApéroxy: peroxydase d'acide ascorbique, DHAA: acide déhydroascorbique, ET: éthylène, GR: glutathion réductase, GSH: glutathion réduit, GSSG: glutathion oxydé, JA: acide jasmonique, PCD: mort cellulaire programmée, PEPc: pyruvate de phosphoénol carboxylase, ROS: espèces réactives de l'oxygène, RuBisCO: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase, SA: acide salicylique, SOD: superoxyde dismutase (Renaut *et al.*, 2009).

De l'atmosphère jusqu'à l'intérieur de la cellule végétale, l'O₃ passe par divers niveaux. Lorsque le mouvement d'air amène l'O₃ à la surface de la feuille, le premier puits (dépôt) d'O₃ rencontré est le dépôt chimique. L'O₃ peut réagir avec les COV (figure 11) émis par les feuilles et donc jouer potentiellement un rôle d'antioxydant (Loreto *et al.*, 2001). Cette réaction varie en fonction de la concentration des COV et leurs réactivités vis-à-vis de l'O₃. Puis avant de pénétrer dans les tissus foliaires, l'O₃ rencontre ensuite une résistance liée à la cuticule sur l'épiderme. La cuticule représente une barrière à la répartition des gaz (Müller et Riederer, 2005), mais l'efficacité de la cuticule dépend de sa structure et de sa composition. L'O₃ pourrait être adsorbé et détruit en réagissant avec des constituants de la cuticule tels que les trichomes, les COV et les composés non volatils (figure 11). Si les réactions dans le headspace (l'air qui entoure la plante) et en surface ne sont pas suffisantes pour éliminer la totalité de l'O₃, ce dernier peut entrer dans les stomates et réagir au niveau des espaces intercellulaires. À ce niveau l'O₃ peut réagir avec diverses molécules de l'apoplasme (eau, protéines, acides gras, sucres etc.) et provoquer la formation de ROS. À ce niveau l'ascorbate présent dans l'apoplasme présente une défense puissante contre l'O₃ (Polle *et al.*, 1995). Cependant, si le pouvoir antioxydant apoplastique est dépassé, O₃ avec les ROS formés réagissent au niveau de la membrane plasmique. A ce niveau les cellules végétales sont directement attaquées et d'autres voies de signalisation sont déclenchées (Baier *et al.*, 2005, Bagard, 2018). Le dépôt d'O₃ stomatique inclut à la fois les pertes dans l'apoplaste et le symplaste (l'intérieur de cellules).

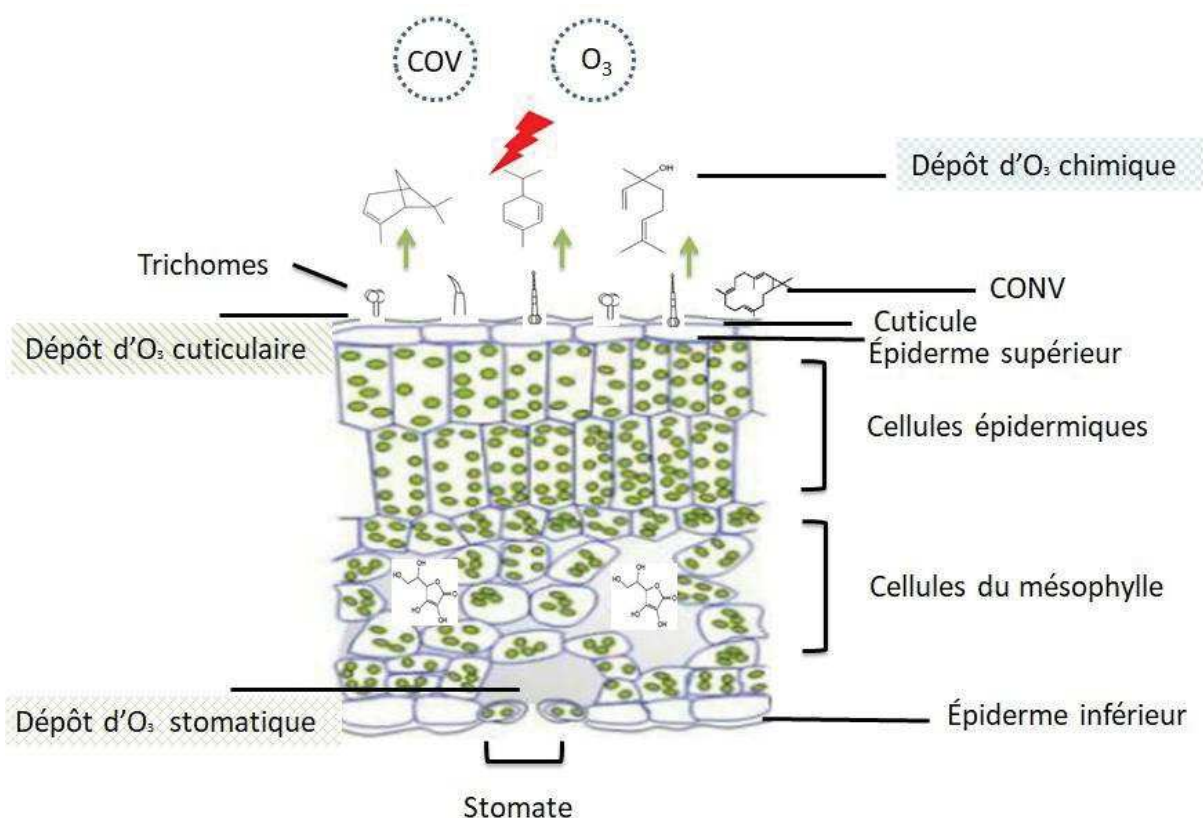


Figure 11. Les trois principaux dépôts d'O₃ sur la plante.

8. Interactions entre stress oxydatif causé par l'ozone et les différents systèmes antioxydants et de défense

La sensibilité des plantes à l'O₃ est variable. Certaines espèces comme le blé, le soja, la laitue, l'oignon et la tomate sont plus vulnérables à l'O₃, alors que l'orge et quelques arbres fruitiers semblent être plus résistants. Un seuil de protection de la végétation a été ciblé par l'agence française de l'environnement depuis l'année 2010 à AOT40 de Mai à juillet de 8h à 20h, 18000 µg/m³.h en moyenne calculée sur 5 ans. AOT 40 (exprimé en µg/m³.h) signifie la somme des différences entre les concentrations horaires supérieures à 80 µg/m³ et le seuil de 80 µg/m³ durant une période donnée en utilisant les valeurs sur 1 heure mesurées quotidiennement entre 8 heures et 20 heures (40 ppb ou partie par milliard=80 µg/m³). Certaines variétés de trèfle et de tabac sont sensibles à des concentrations très faibles d'O₃ (de l'ordre de 25 ppb, soit 50 µg/m³) (agence française de l'environnement). Les différences de sensibilité entre les plantes sont dues probablement à des caractéristiques physiques, chimiques ou physiologiques de la structure des feuilles à leurs compositions en COV et en métabolites secondaires anti oxydants (Fares *et al.*,2008, Jud *et al.*,2016).

INTRODUCTION GENERALE

8.1. Acide ascorbique et dérivées

L'O₃ entre dans la feuille par les stomates, il réagit rapidement avec les fluides apoplastiques, conduisant à la formation de ROS, y compris le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂), les radicaux hydroxyles (OH⁻) et superoxyde (O₂⁻). En fait, la formation de ROS ne se produit pas seulement sous stress, les ROS sont formés en continu dans les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes et l'apoplaste en tant que sous-produits du métabolisme aérobie normal de la cellule (Bagard,2008). Sous un stress oxydatif, des excès de ROS s'accumulent suite à un déséquilibre entre la balance des ROS et les systèmes de défense (antioxydants). La capacité de la plante à minimiser les effets de l'O₃ est liée à la quantité d'antioxydants présents dans la feuille qui sont capables de supprimer les effets nocifs de et réduire les formations des ROS (Pääkkönen *et al.*, 1997). Ces antioxydants pourraient être des pièges enzymatiques des ROS tels que le superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase ou non enzymatiques tels que l'ascorbate, le glutathion, l' α -tocopherol et la vitamine E. L'ascorbate est généralement considéré comme la première ligne de défense contre l'O₃ (Polle *et al.*, 1995). Son action est résumée dans le cycle de Halliwell-Asada-Foyer (Noctor et Foyer, 1998). Ce cycle pourrait débiter dans l'apoplasme ou dans le cytosol par l'action de l'ascorbate sur les ROS ou par déhydroascorbate (DHA) (ascorbate oxydé) (figure 12). Dans le cytosol, l'ascorbate est régénéré par une enzyme la DHA réductase, qui utilise le glutathion réduit (GSH) en tant que donneur d'électrons. Le glutathion réduit est à son tour régénéré par la glutathion réductase suite à l'oxydation d'une molécule de NADPH issue des processus photochimiques et cataboliques (figure 12) (Bagard,2008).

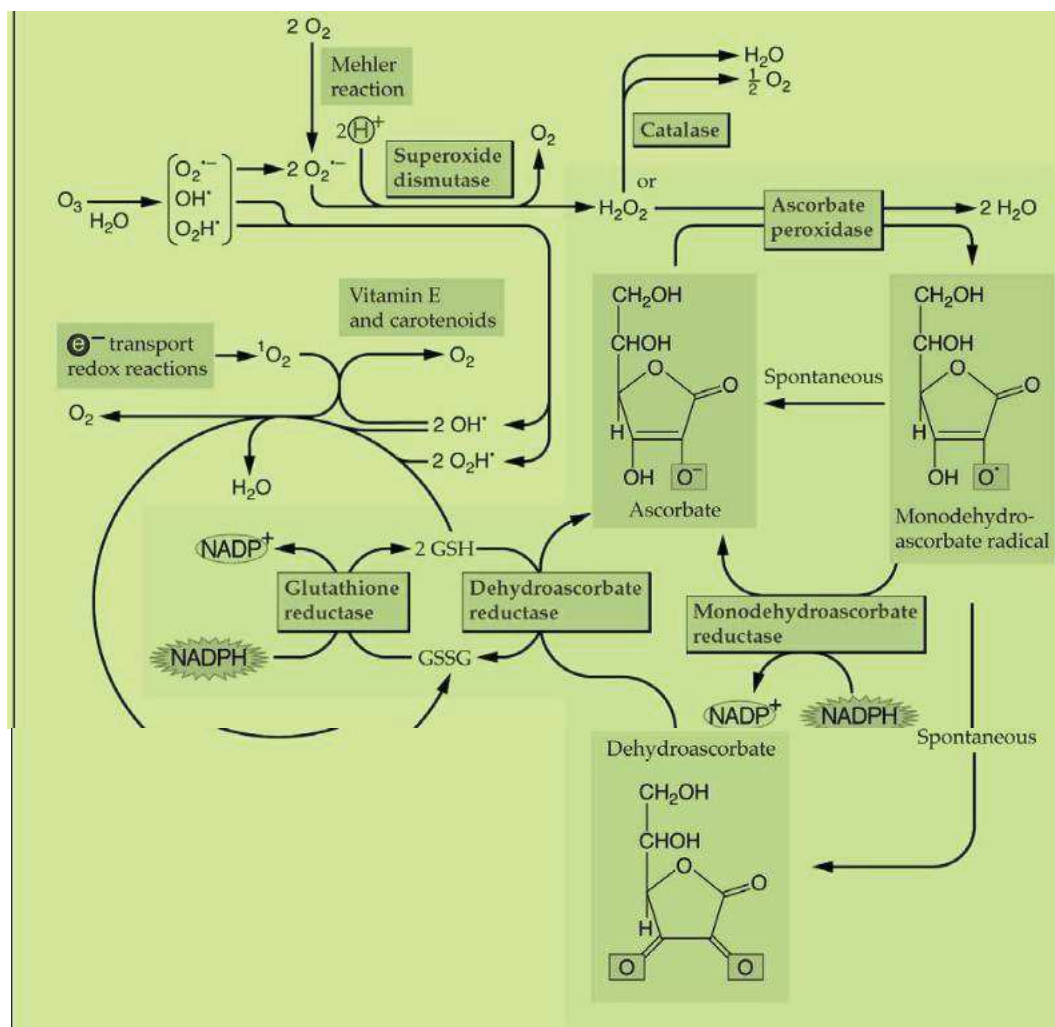


Figure 12. Système antioxydant cellulaire. Les espèces oxygénées réactives (ROS) dérivées de l' O_3 (anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, radical hydroxyle $HO^{\cdot}$, radical perhydroxyle $HO_2^{\cdot}$ et peroxyde d'hydrogène H_2O_2) et issues de la photochimie (oxygène singulet 1O_2) sont prises en charge par des composés non enzymatiques (ascorbate, glutathion, α -tocophérol ou vitamine E, caroténoïdes) et par l'activité de diverses enzymes (SOD, catalase, APX, MDHAR, DHAR, GR). Le cycle de Halliwell-Asada- Foyer figure en vert foncé dans la partie droite du schéma (Bagard, 2008).

8.2. Implication des trichomes et de leurs exsudats dans la protection contre l'ozone

La surface des feuilles est l'interface entre l'environnement et l'intérieur des feuilles représentant une première ligne de défense, par ex. via la fonction des trichomes. Ces derniers peuvent protéger la plante contre l' O_3 de différentes manières en fonction du type de trichomes. Pour tous les trichomes, en augmentant la surface et la résistance de la couche limite air-feuille avec les stomates. Pour les trichomes glandulaires, les métabolites secondaires volatils et non-volatils produits et accumulés réagissent avec l' O_3 avant son dépôt stomatique. Les composés non volatils tels que les diterpénoïdes

INTRODUCTION GENERALE

pourraient piéger également l'ozone. Jud *et al.* (2016) ont montré chez une variété de tabac que le diterpénoïde cis-abienol secrété par les trichomes glandulaires (principalement les capités) agissait comme une barrière chimique, contre l'O₃ et diminuait son absorption stomatique en le détruisant à la surface des feuilles. Le rôle de la densité des trichomes glandulaires dans la résistance à l'O₃ a été reporté par Li et ses collaborateurs (2018) dans une étude portant sur 24 espèces différentes et montrant que les espèces à faible densité de trichomes glandulaires étaient plus sensibles à O₃ que les espèces à forte densité de trichomes. En outre, les trichomes non glandulaires n'ont pas participé au dépôt d'O₃ et à la résistance des plantes (Li *et al.*, 2018). Les trichomes glandulaires ne sont pas les seules sources possibles de COV chez les plantes. Ces derniers peuvent être produits de novo constitutivement ou après induction par un stress. Ces COV peuvent renforcer le dépôt chimique dans le headspace et le dépôt apoplastique notamment quand les stomates se ferment partiellement et que les COV s'accumulent dans les cavités sub-stomatiques. Dans l'étude de Memert (2019) sur la réactivité des COV avec l'O₃ dans la forêt de Landes qui est principalement composée de pins maritimes (grands émetteurs de monoterpènes), les sesquiterpènes ont dominé la consommation d'O₃ par les COV et plus particulièrement le β-caryophyllène (30-60%). Les monoterpènes ont représenté 30 à 50% de la destruction d'O₃ en phase gazeuse, le linalool a été responsable jusqu'à 15% de la destruction de l'O₃, le myrcène, le terpinolène ou encore l'α-phellandréne ont contribué respectivement à 2, 12 et 17 fois plus à la réactivité monoterpènes qu'à leur concentration totale. Cependant l'α- et β- pinène ont contribué respectivement à 2 et 5 fois moins à leur contribution à la concentration totale de monoterpènes respectivement. Ces facteurs s'expliquent par la forte disparité de réactivité des composés mesurés vis-à-vis de l'O₃. Hellén *et al.* (2018) ont également observé que les sesquiterpènes avaient plus d'impact sur la réactivité que prévu dans les forêts boréales. En outre, les plantes de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum*) qui ont été conçues pour émettre de l'isoprène sont plus résistantes à la toxicité de l'O₃ que les types sauvages non émetteurs (Vickers *et al.*, 2009). De même, la sensibilité à l'O₃ des clones de peuplier est inversement proportionnelle à leur capacité à émettre l'isoprène (Calfapietra *et al.*, 2008). Fares *et al.* (2008) rapportent que les réactions de l'O₃ en phase gazeuse avec les monoterpènes émis par les chênes contribuent de manière significative à la destruction de l'O₃. Tandis que Behnke *et al.* (2009) ont rapporté qu'un génotype émetteur d'isoprène était plus sensible à l'O₃ qu'un mutant non émetteur. L'efficacité de la réaction des COV avec O₃ dépend donc de leur réactivité avec l'O₃ (tableau 1) et de la quantité des COV émises. L'effet de l'O₃ sur les émissions des COV est décrit dans le tableau 3.

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1. Coefficients de vitesse de phase gazeuse (k) pour la réaction des terpènes avec l'O₃ (2,46 molécules cm⁻³ s⁻¹, 135 ppbv) à 296 K (Acton *et al.*, 2018 et les références ci-dessous).

Terpènes	K _{O3}	références
limonène	2.0×10^{-16}	Atkinson <i>et al.</i> (1990)
α -pinène	8.4×10^{-17}	Lee <i>et al.</i> (2006)
β -pinène	1.5×10^{-17}	Lee <i>et al.</i> (2007)
γ -terpinène	1.4×10^{-16}	Atkinson <i>et al.</i> (1990)
δ -3-carène	3.78×10^{-17}	Atkinson <i>et al.</i> (1990)
δ -2-carène	23.6×10^{-17}	Atkinson <i>et al.</i> (1990)
β -phellandrène	17.20×10^{-17}	Atkinson <i>et al.</i> (1990)
terpinolène	1.29×10^{-15}	IUPAC (2017)
β -ocimène	3.74×10^{-16}	Kim <i>et al.</i> (2011)
β -myrcène	3.74×10^{-16}	Kim <i>et al.</i> (2011)
α -terpinène	3.74×10^{-14}	Calvert <i>et al.</i> (2015)
α -phellandrène	3.00×10^{-15}	Calvert <i>et al.</i> (2015)
linalool	4.39×10^{-16}	Atkinson <i>et al.</i> (1995)
β -caryophyllène	1.2×10^{-16}	Shu et Atkinson (1994)
α -copaène	8.7×10^{-16}	Shu et Atkinson (1994)
α -humulène	1.2×10^{-16}	Shu et Atkinson (1994)

Leur structure moléculaire régit également le temps de vie de ces composés (tableau 2) (appelé le temps de résidence) en réaction avec l'O₃.

Tableau 2. Temps de résidence des COV fréquemment produits et émis par les plantes de tomate (sauf isoprène) en réaction avec l'O₃ (d'après Atkinson et Arey, 2003). J : jour, h : heure, min : minutes.

	Composé	Temps de vie
Monoterpènes	isoprène	1.3 J
	α -pinène	4.6h
	β -pinène	1.1 jour
	δ -2-carene	1.7 h
	(E)- β -ocimène	44 min
	myrcène	52 min
	β -phellandrène	7.6 h
	γ - terpinène	2.6h
	p-cymène	>331 J
	linalool	55 min
Sesquiterpènes	(E) β -caryophyllène	2 min
	α -humulène	2 min
	α -copaène	2.6 h

INTRODUCTION GENERALE

Le temps de résidence d'un composé dans l'atmosphère est défini comme le temps de vie de ce composé ou le temps qu'il faut à un facteur ou processus donné : oxydation par exemple, pour réduire sa concentration initiale. Afin de calculer le temps de résidence d'un composé en réaction avec l'O₃, la concentration de l'oxydant l'O₃ est fixée à une concentration ambiante caractéristique moyenne de la troposphère O₃ : 7×10^{11} molécules cm⁻³ (valeur moyenne sur 24h) (Atkinson et Arey, 2003). Le temps de résidence permet d'illustrer la réactivité des COV (Mermet, 2019).

8.3. Implication d'autres traits d'anatomie et morphologie de feuilles

Il a été proposé que les feuilles minces, contenant une proportion élevée d'espace intercellulaire étaient plus sensibles à l'O₃, cela due à sa propagation rapide dans la feuille. Alors que les feuilles épaisses avec peu d'espaces intercellulaires étaient résistantes à l'O₃ (Oksanen *et al.*, 2004), en raison du ralentissement de pénétration de l'O₃ et de sa potentielle réaction avec les COV et les métabolites secondaires. Au niveau cellulaire, la présence des mitochondries et des peroxysomes en grandes quantités pourrait renforcer la capacité de destruction de l'O₃ (Oksanen *et al.*, 2004) et empêcher la réduction de la photosynthèse. Etant donné que les stomates contrôlent les échanges gazeux (Woodward et Kelly, 1995), la fermeture des stomates pourrait être un mécanisme efficace pour réduire le dépôt d'O₃ stomatique et minimiser son entrée dans la feuille.

9. Effet de l'ozone sur les émissions des COV

Les effets de l'ozone sur les émissions de COV sont variables. Ryan *et al.* (2009) ont montré que deux génotypes de peupliers hybrides, avec des sensibilités différentes à l'O₃, avaient des émissions des COV différentes. Le génotype tolérant à l'O₃ était capable de maintenir son taux d'émission d'isoprène lorsqu'il était exposé à 120 ppb d'O₃ 6 heures par jour pendant 8 jours, alors que le génotype sensible à l'O₃ a diminué ses émissions d'isoprène lors de l'exposition à l'O₃. Cependant, un effet contrasté a été observé dans une variété de tabac, où une teneur élevée en O₃ augmente considérablement les émissions des COV du clone sensible à l'O₃ (Heiden *et al.*, 1999). Les différences observées en réponse à O₃ pourraient être dues aux différences physiologiques des plantes et des conceptions expérimentales utilisées. Le tableau 3 ci-dessous résume l'effet de l'O₃ sur les émissions des COV sur certaines espèces d'après Laothawornkitkul *et al.* (2009).

INTRODUCTION GENERALE

10. Tomate : plante modèle

L'étude a porté sur la tomate (*Solanum lycopersicum*) qui fait partie de la famille de solanacées, au même titre que d'autres espèces de grande valeur économique et agronomique comme la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), l'aubergine (*Solanum melongena*) et les piments (*Capsicum*). La tomate est originaire de l'ouest d'Amérique du sud au Mexique et les premières variétés ont été introduites en France en 1778. La Chine, l'Inde et les Etats-Unis sont les plus grands producteurs des tomates dans le monde (FAO). La richesse génétique et allélique de la tomate, sa diversité taxonomique, l'existence de nombreuses ressources génétiques et de mutants, ainsi que le séquençage de son génome font de la tomate une plante modèle de première importance en agronomie, en physiologie végétale et en génétique. Le génome de la tomate comprend 12 paires de chromosomes ($2n=24$, taille du génome estimée à 950 Mpb encodant environ 35 000 gènes). La tomate est aussi le premier fruit consommé dans le monde (14 kg par famille et par an en France selon plantescopie). C'est une source de minéraux (notamment potassium), de vitamines (principalement vitamine C avec 10 à 20 mg/100g), de caroténoïdes et composés phénoliques. La composition des fruits et des feuilles varie entre les espèces et les génotypes et dépend des conditions de culture. D'un point de vue écologique, la tomate est cultivée dans des conditions très variables et certaines espèces peuvent s'adapter à des conditions extrêmes. La tomate possède également des trichomes de différente nature et est donc appropriée à notre étude sur l'O₃. Les trichomes glandulaires de la tomate synthétisent et stockent des composés volatils, semi ou non volatils, terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes), flavonoïdes et polyphénols, acides aminés et acides gras et acyl-sugars (Slocombe *et al.*, 2008).

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 3. Effet de l'ozone sur les émissions des COV (A, augmentation ; D, diminution ; mono, monoterpènes ; iso, isoprène) d'après Laothawornkitkul *et al.* (2009).

Références	Sous-description	Méthode de fumigation	Niveau O ₃ (ppbv)	Période de fumigation	Echelle de mesure COV	Plante	Répétition (n)	Temps de mesure des COV	Effet des COV sur les émissions
Penuela <i>et al.</i> (1999)	Observation sur le terrain	Chambre à toit ouvert	Ambiant +40	8h	Plantes entières Enceinte foliaire	<i>Pinus halepensis</i> L. <i>Solanum lycopersicum</i> L. var Tiny Tim	3	Non spécifié	Sans effet significatif (COV totaux) A ~74% (COV total)
Heiden <i>et al.</i> (1999)	Observations de laboratoire	Chambre cylindrique	120-170	5h	Enceinte	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel B (Tolérante O ₃)	2-3	24h après fumigation	Sans effet significatif (COV totaux) A ~270% (COV totaux)
	Observations de laboratoire	Chambre cylindrique	120-170	5h	Enceinte	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3 (Sensible O ₃)	2-3	24h après fumigation	
Llusia <i>et al.</i> (2002)	Observations sur le terrain	Chambre à toit ouvert	50	8h par jour pendant 2ans	Non spécifié	<i>Pinus sylvestris</i> L.	4		Significatif. Présence de COV C ₆ 140% (mono) A ~ 65% (COV totaux des 4 espèces)
	Observation sur le terrain	Chambre à toit ouvert	Ambiant +40	8h	Enceinte foliaire	<i>Ceratonia siliqua</i> L. <i>Olea europaea</i> L. <i>Quercus ilex</i> spp. <i>ilex</i> L. <i>Quercus ilex</i> spp. <i>rotundifolia</i> L.	3		
	Plantes cultivées en pots								
	Plantes âgées de 3 ans								
Loreto <i>et al.</i> (2004)	Observation de laboratoire Plantes cultivées en pots	Chambre de croissance Fumigation de la plante entière	100-200	4h par jour pendant 5 jours	Enceinte foliaire	<i>Quercus ilex</i> L.	4	2 jours après fumigation	A ~182% (mono)
Loreto <i>et al.</i>	Plantes âgées de 3ans	Cuvette	250	4h	Enceinte	<i>Quercus ilex</i> L.	4	4h après	A ~ 60% (mono)

INTRODUCTION GENERALE

(2004)	Observation de laboratoire Plantes cultivées en pot	d'échanges gazeux Fumigation sur une seule feuille			foliaire excisée			fumigation	
Vuorinen <i>et al.</i> (2004a)	Plantes âgées de 3ans Observation de laboratoire Plantes cultivées en pot	Chambre de croissance Fumigation de la plante entière	150-400	8h pour le premier jour Heures non spécifiées pour le 2 nd jour	Enceinte	<i>Phaseolus lunatus</i> cv. Sieva	6	Peu après la fumigation	A ~36% (COV totaux)
Velikova <i>et al.</i> (2005)	Observation de laboratoire Plantes cultivées en pot	Cuvette d'échanges gazeux Fumigation sur une seule feuille	300	3h	Enceinte foliaire excisée	<i>Phragmites australis</i> L.	6	Immédiatement après fumigation	A ~ 55% (iso)
Calfapietra <i>et al.</i> (2008)	Observation sur le terrain Plantes âgées de 10 ans	système de fumigation à l'air libre (FACE)	65	Long terme	Enceinte foliaire	<i>Populus tremuloides</i> (271 O ₃ -tolérante) <i>Populus tremuloides</i> (42 O ₃ -sensible)	3 3	Les mesures des deux clones réalisées à la concentration d'O ₃ à laquelle les plantes poussaient	Sans effet significatif (iso) D ~ 20% (iso)
Ryan <i>et al.</i> (2009)	Observation de laboatoire Plantes cultivées en pot	Chambre de croissance	120	6h pendant 8 jours	Enceinte foliaire	<i>Populus deltoides</i> x <i>P. trichocarpa</i> (O ₃ -tolerante) <i>P. deltoides</i> x <i>P. trichocarpa</i> (O ₃ -sensible)	3-4	Peu après la fumigation	Sans effet significatif (iso) D ~ 18% (iso)

**OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DE LA
THESE ET STRATEGIES DE
RECHERCHE**

Durant les trois ans de la thèse, mon travail s'est focalisé sur le rôle des trichomes et des COV stockés et émis par les plantes de tomate dans la réponse au stress oxydatif causé par l'O₃. Les objectifs de la thèse étaient dans un premier temps de caractériser les niveaux émissions des COV des parties aériennes et souterraines dans des conditions non stressées et étudier l'origine de ses émissions, ce qui a été fait sur les 8 parents d'une population de tomate de grande diversité génétique appelée MAGIC TOM. Dans un second temps, une caractérisation morphologique et histochimique des trichomes et une analyse de la localisation des principaux COV stockés ont été réalisées chez différents parents sauvages de tomate et leurs mutants affectés sur les propriétés des trichomes. Enfin le cœur de thèse avait pour objectif de mieux comprendre leurs rôles dans la résistance contre l'O₃.

Le présent document est divisé en trois chapitres :

Chapitre I. Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato.

Pour cette partie, notre hypothèse était que la tomate est un émetteur constitutif fort de COV, qui proviennent principalement des réservoirs de COV préformés dans les trichomes, et qui varient peu entre les génotypes et cultivars. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé un criblage des émissions des COV des parties aériennes de huit génotypes qui sont les parents de la population MAGIC TOM, et qui proviennent de deux accessions différentes, l'une à gros fruits et l'autre à petits fruits, et qui présentent une large variabilité génétique. Les émissions du feuillage de chaque génotype ont été étudiées dans des conditions environnementales contrôlées. Pour mieux comprendre l'origine des COV émis, j'ai mesuré les émissions de COV à la lumière et à l'obscurité et comparé les spectres d'émission avec les teneurs foliaires en COV. Cela m'a permis de choisir des phénotypes contrastés pour une deuxième expérience (chapitre 3). En outre, j'ai réalisé un criblage des émissions des COV des parties souterraines (racines) de ces mêmes génotypes afin d'examiner la relation entre les émissions et la composition des COV des feuilles et des racines. Nous avons posé l'hypothèse que la capacité d'un génotype à produire les COV racinaires pourrait être liée à sa capacité à produire les COV foliaires. Les résultats de cette étude ont fait objet d'une publication scientifique dans le journal Molécule (MDPI).

Chapitre II. Identification et quantification des émissions de COV constitutives des parents sauvages et de leurs mutants chez la tomate- Etude morphologique et histochimique des trichomes- Localisation des principaux COV dans les trichomes.

L'objectif de ce chapitre était de caractériser les émissions des COV constitutifs et les trichomes

chez 3 parents sauvages de tomate et leurs mutants respectifs, pour lesquels la mutation affecte la densité des trichomes. Pour cela, un criblage des émissions et des teneurs en COV constitutifs a été réalisé ainsi qu'une étude d'histochimie et d'imagerie microscopique. L'objectif était de déterminer les différences de morphologie et/ou de composition des trichomes, ainsi que de localiser les terpènes (classe des COV la plus abondante chez la tomate) et les aldéhydes dans les trichomes par des colorations spécifiques. Nous avons émis l'hypothèse que les différents types de trichomes chez les génotypes étudiés, ont des morphologies variables et que la localisation et le stockage des composés dépendent des types de trichomes glandulaires.

Chapitre III. Le rôle des trichomes et les COV dans la réponse de la plante au stress oxydatif causé par l'ozone

Cette partie avait pour objectif de comprendre le rôle des composés émis et/ ou stockés dans les trichomes dans la résistance à un polluant atmosphérique, l'ozone. Cette étude a été réalisée sur les mêmes génotypes que ceux utilisés dans le deuxième chapitre et deux génotypes sélectionnés de la première étude. Pour cela, j'ai exposé les plantes à des concentrations d'ozone définies sous conditions environnementales contrôlées afin d'estimer des différents dépôts d'ozone et d'évaluer l'impact sur les plantes par des mesures éco physiologiques (photosynthèse, conductance stomatique, fluorescence de la chlorophylle, dégâts physiques) et des mesures des émissions et des teneurs de COV induits par le stress. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la densité de trichomes à la surface des plantes affectait le dépôt d'ozone surfacique alors que la production et l'émission des COV affectait le dépôt chimique. L'ozone a été choisi comme facteur de stress oxydatif, car il est techniquement facile à manipuler dans les chambres garantissant un contrôle rigoureux des conditions expérimentales et climatiques (Oksanen *et al.*, 2014). Cependant, les résultats de cette étude peuvent être appliqués plus largement à d'autres facteurs de stress oxydatif, tels que la lumière, les températures extrêmes, les métaux lourds et de nombreux autres polluants atmosphériques (Suzuki *et al.*, 2014).

CHAPITRE I

Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato

CHAPITRE I

Le premier chapitre de la thèse présente un criblage des émissions de COV constitutifs des parties aériennes et souterraines des 8 parents de la population MAGIC Tom, qui représentent une forte variabilité génétique. L'objectif était d'une part d'évaluer la gamme de variabilité génétique des émissions de COV, et d'autre part de dissocier les sources/origines des émissions dans les plantes (stockés ou synthétisés *de novo*). J'ai également caractérisé les émissions du sol et des racines, et examiner la relation entre les parties aériennes et souterraines. Ce chapitre permet de discuter l'intérêt des COV pour la surveillance des cultures ou le phénotypage des ressources génétiques. En effet les émissions de COV constitutifs peuvent servir de marqueurs pour des génotypes spécifiques (voir tableau 3, annexe 1). À l'issue de ce criblage, deux génotypes contrastés de par leurs émissions de COV ont été choisis afin d'examiner le rôle des COV dans la résistance des plantes à l'O₃ (Chapitre 3). Les émissions du feuillage étaient composées de terpènes, dont la majorité était également stockée dans les feuilles. Elles étaient très faibles, en partie dépendantes de la lumière et différaient considérablement entre les génotypes, tant en quantité qu'en qualité. Le sol avec les racines émettait des COV à des taux similaires, bien que plus variables que ceux du feuillage. Les émissions du sol ont été caractérisées par des terpènes, des alcanes et alcènes oxygénés et des composés phénoliques, dont seuls quelques-uns ont été retrouvés dans des extraits de racines à de faibles concentrations. Les analyses de corrélation ont révélé que plusieurs COV émis par le feuillage ou le sol sont régulés conjointement et que les sources aériennes et souterraines sont partiellement interconnectées. En ce qui concerne le suivi *in vivo* des COV dans les cultures de tomates, nos résultats soulignent que la variabilité génétique, la synthèse *de novo* dépendante de la lumière et les sources souterraines sont des facteurs à considérer pour une utilisation efficace dans la surveillance des cultures.

Article

Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato

Nafissa Dehimeche ¹, Bruno Buatois ¹, Nadia Bertin ² and Michael Staudt ^{1,*}

¹ Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS-Université Montpellier-Université Paul-Valéry Montpellier-EPHE, Campus CNRS, CEDEX 5, F-34293 Montpellier, France; nafissa.dehimeche@cefe.cnrs.fr (N.D.); bruno.buatois@cefe.cnrs.fr (B.B.)

² INRAE, UR115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Site Agroparc, 84914 Avignon, France; nadia.bertin@inrae.fr

* Correspondence: michael.staudt@cefe.cnrs.fr; Tel.: +33-467613272

Abstract: The in-vivo monitoring of volatile organic compound (VOC) emissions is a potential non-invasive tool in plant protection, especially in greenhouse cultivation. We studied VOC production from above and belowground organs of the eight parents of the Multi-Parent Advanced Generation Intercross population (MAGIC) tomato population, which exhibits a high genetic variability, in order to obtain more insight into the variability of constitutive VOC emissions from tomato plants under stress-free conditions. Foliage emissions were composed of terpenes, the majority of which were also stored in the leaves. Foliage emissions were very low, partly light-dependent, and differed significantly among genotypes, both in quantity and quality. Soil with roots emitted VOCs at similar, though more variable, rates than foliage. Soil emissions were characterized by terpenes, oxygenated alkanes, and alkenes and phenolic compounds, only a few of which were found in root extracts at low concentrations. Correlation analyses revealed that several VOCs emitted from foliage or soil are jointly regulated and that above and belowground sources are partially interconnected. With respect to VOC monitoring in tomato crops, our results underline that genetic variability, light-dependent de-novo synthesis, and belowground sources are factors to be considered for successful use in crop monitoring.

Keywords: aboveground-belowground interactions; biomarkers; chemodiversity; isoprene; monoterpenes; salicylate; sesquiterpene; *Solanum lycopersicum*; volatile organic compound emission



Citation: Dehimeche, N.; Buatois, B.; Bertin, N.; Staudt, M. Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato. *Molecules* **2021**, *26*, 237. <https://doi.org/10.3390/molecules26010237>

Academic Editors: Andrea Liliana Clavijo McCormick, Ülo Niinemets and Velemir Ninkovic

Received: 10 December 2020

Accepted: 31 December 2020

Published: 5 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Like all living organisms, plants exchange a huge number of volatile metabolites with their environment at their aboveground and belowground organs [1]. More than 1700 organic gases, collectively referred to as Volatile Organic Compounds (VOCs), are currently known to be produced and released by plants. The majority are terpenoids, phenolic compounds (benzenoids, phenyl-propanoids), and derivatives of fatty and amino acids. Especially under detrimental life conditions and biotic aggressions, plants release a large variety of stress-induced VOCs, whose blend depends on the type and intensity of stress [2] and the inherent capacity of the plant to produce these [3]. Stress-induced VOCs are not only simple byproducts of tissue damages, but many of them are produced by specialized enzymes that are activated in response to the aggressors as part of a local or systemic reaction cascade [4]. Numerous studies have demonstrated the roles of VOCs in plant defense, acting either directly by repelling biotic stressors or indirectly by attracting natural enemies [5]. In addition, VOCs that are released into the atmosphere or soil are involved in within-plant and between plant stress signaling [6,7]. Plant VOCs also affect the food web by serving as cues for herbivores to localize their host plants, or as a food source for microbes in both the rhizosphere and phyllosphere [8–10].

Owing to their multiple roles in plant ecology and advances in the real-time detection of trace gases (e.g., [11,12]), the study of VOCs that are emitted by crop plants has received increasing attention in the field of agroecology and crop protection. Provided that the emitted VOCs can be unequivocally identified and quantitatively measured without disturbing the actual physiological status of the plants, the online monitoring of the volatile metabolome represents a valuable non-invasive tool for early stress detection and survey of variation in plant fitness and phenology [13–15]. Greenhouse crops are particularly suitable for this application, due to the lower and more constant air exchange than in the field, which favors the accumulation of trace gases in the air to values that are distinguishable from the background [16]. In recent years, several pilot studies on tomato have proven the potential usefulness of VOC monitoring, but also revealed limitations and obstacles to overcome [11,17–20]. One prerequisite for a successful application is a sound knowledge of the natural variability of VOC release under non-stressed conditions. Yet, establishing an accurate reference baseline of VOC emission is not straightforward, mainly due to the possible heterogeneity of VOC sources and pitfalls in the measurement methods: first, the quantity and composition of VOCs may vary among cultivars [21,22]. Second, root emissions and VOC exchanges at the soil/air interface can blur the chemical messages that are released by the foliage and vice-versa. Third, tomato leaves and stem are more or less densely covered by glandular trichomes [23,24], whose tips contain large amounts of VOCs. Even tiny movements and mechanical disturbance can cause large emission bursts without any relation to biotic stress [18,25]. Fourth, the actual emission rate also depends on environmental factors, such as temperature, light conditions, atmospheric CO₂, and soil properties, whose potential influences must be considered during measurements and data interpretation [26–28].

In order to gain more insight and provide new references for further studies, we investigated the genetic variability of constitutive VOC production in vegetative tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). We performed a screening study on the eight parents (accessions) of the MAGIC tomato populations (Multi-Parent Advanced Generation Inter-cross population of Tomato) representing a large genetic variability [29]. This population presents an exceptional wide range of genetic variation, a saturated genetic map, and it is particularly amenable to QTL detection and causal polymorphism identification [29,30]. These parents include four genotypes from the *Solanum lycopersicum lycopersicum* group with large fruits and four genotypes from the *Solanum lycopersicum cerasiforme* group with cherry-type fruits. VOC emissions were measured quantitatively under environmentally controlled conditions (temperature, incident light, [CO₂], and air humidity) with our recently developed exposure chambers allowing for distinguishing the above-ground organs from soil and root system. In addition, we analyzed the VOC contents in leaves and roots and tested the effect of light on foliar emissions to better understand the origins of the emitted VOCs.

2. Results

2.1. Aboveground VOC Production and CO₂/H₂O Gas Exchange

Tomato foliage emitted VOCs in low quantities, despite its aromatic character. The most abundant, regularly emitted ones were the monoterpenes β -phellandrene, δ -2-carene, linalool, α -pinene, and the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene (Figure 1, supplementary material Tables S1 and S2). The five major compounds emitted under light conditions represented between 55 and 85% of the total emission, depending on the genotype. The remaining was composed of 10 monoterpenes (or derivatives), including β -pinene, myrcene, α -phellandrene, α -terpinene, *p*-cymene, β -ocimene, γ -terpinene, terpinolene, (*Z*)-2,6-dimethyl-2,6-octadiene, and four sesquiterpenes, namely δ -elemene, α -humulene, and germacrene-D, plus one unknown sesquiterpene. These minor emissions were more or less close to the detection limit of our system and, therefore, not consistently found in all of the replicate measurements.

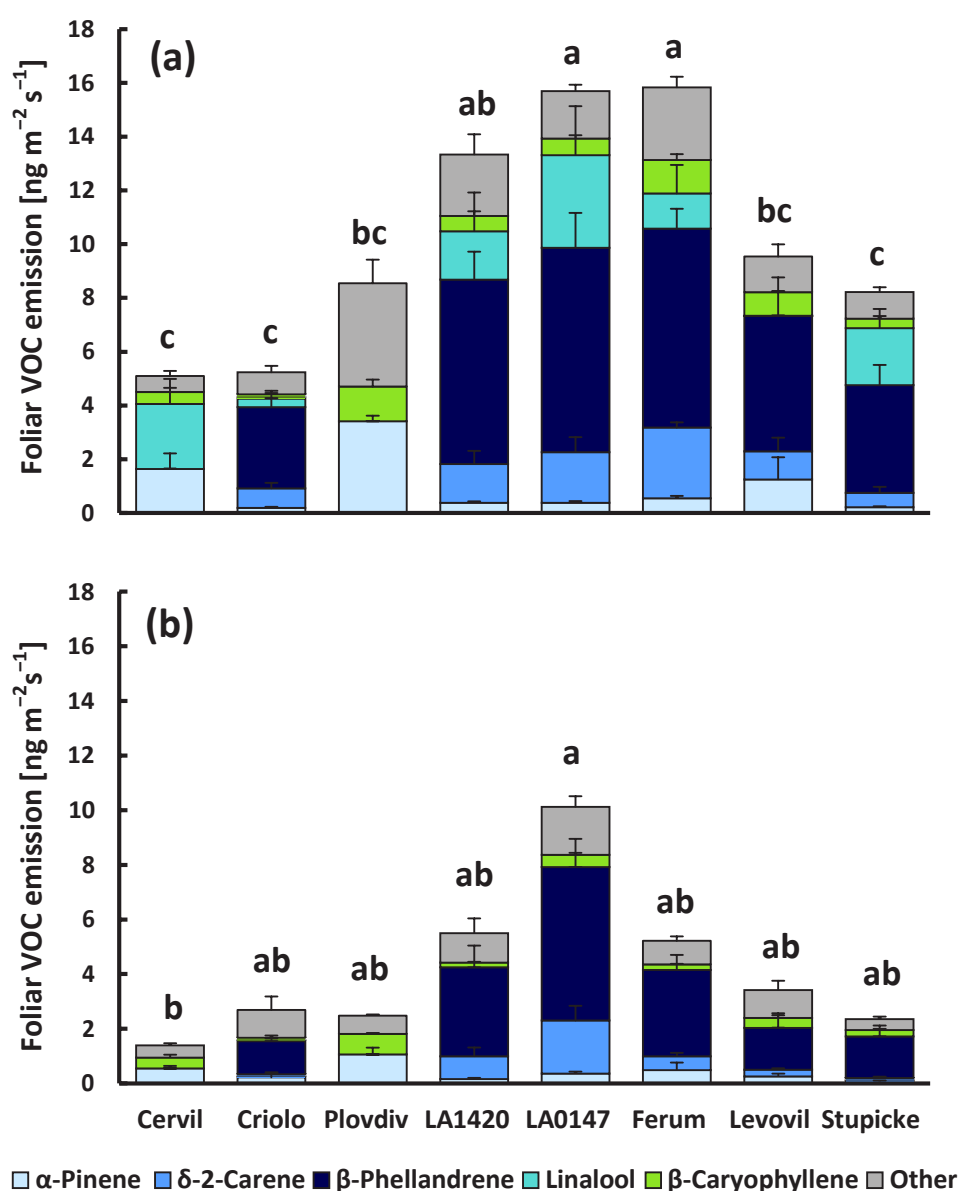


Figure 1. Foliar Volatile Organic Compounds (VOC) emissions of the eight accessions of the MAGIC tomato population under light (a) and dark conditions (b). Cervil, Criolo, Plovdiv24A (referred to as Plovdiv) and LA1420 belong to the *Solanum lycopersicum cerasiforme* group with cherry-type fruits, while LA0147, Ferum, Levovil and Stupicke Polni Rane (referred to as Stupicke) belong to the *Solanum lycopersicum lycopersicum* group with large fruits. Column sections show the mean emissions + SE ($n = 4-6$) of the five major emitted compounds and the sum of all other compounds. Superscript letters denote significant differences ($p < 0.05$) between genotypes for the sum of VOC emissions based on Bonferroni tests following an ANOVA ($p < 0.001$) and Dunn's test following a Kruskal–Wallis test ($p = 0.022$) for light and dark VOC emissions, respectively (see supplementary material Table S2 for more details).

At 30 °C and lighted conditions, the mean rate of total VOC release was $10.2 \pm 1.5 \text{ ng m}^{-2} \text{ leaf area s}^{-1}$ ($1.87 \pm 0.31 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ leaf dry weight h}^{-1}$) across all of the genotypes. The emission rates (sum of total VOCs and sum of main VOCs) were significantly different between genotypes ($p < 0.001$, Figure 1a and Supplementary material Table S2), while there was no genotypic effect on $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ gas exchange parameters apart from transpiration ($p = 0.023$, Cervil > Criolo, data not shown). Genotypic differences in VOC emissions were mostly due to variability in the emissions of monoterpenes (the sum of monoterpenes, $p < 0.001$),

and less to variability in sesquiterpene emissions (sum of sesquiterpenes $p = 0.087$). Regarding the main compounds, three cherry tomato genotypes from the *cerasiforme* group (Cervil, Criolo and Plovdiv) had consistently lower emissions than all other genotypes, with β -phellandrene and δ -2-carene being absent in the emissions of Cervil and Plovdiv. However, Cervil and Plovdiv emitted α - and β -pinene at much higher rates than the other genotypes that are dominated by high emissions of β -phellandrene and δ -2-carene (mean α -pinene emissions of 2.43 ± 0.46 and 0.45 ± 0.14 ng m⁻² s⁻¹ for Cervil and Plovdiv, and other genotypes, respectively). Linalool emissions were highly variable and they occurred rather sporadically in all genotypes. When released, linalool emissions scaled positively with the foliar CO₂-assimilation rate ($R^2 = 0.44$, data not shown). The linalool emissions did not correlate to the emission of any other VOC. On the contrary, the emissions of all other compounds correlated to each other in a given VOC class (see Supplementary material Figure S1 for examples).

When plants were darkened (Figure 1b), the total aboveground VOC emission was reduced by 60%, on average, when compared to light conditions (4.2 ± 1.0 ng m⁻² s⁻¹ and 0.71 ± 0.17 μ g g⁻¹ h⁻¹). Darkening reduced emissions of all genotypes, albeit the effect was not significant for LA0147, whose dark emissions largely scattered among replicates. Sesquiterpene emissions were generally less reduced by darkness than monoterpenes (40% vs. 65%) and not significantly affected in seven of eight genotypes. Looking at individual VOCs, most of the main and trace compounds were still released in darkness, except linalool, β -pinene, and (*Z*)-2,6-dimethyl-2,6-octadiene, which could never be detected in the absence of light, regardless of the genotype (Figure 1b, Supplementary material Table S2). Dark emissions were different among genotypes, although the differences were less significant than for light emissions ($p = 0.022$ and 0.021 for total VOC and sum of major VOC emissions). Pairwise comparisons of genotypes revealed that only the dark emissions of Cervil and LA0147 were significantly different one from each other. Nevertheless, the pattern of genotypic variability of dark emissions was similar to that of light emissions. Foliar VOC contents that were gained from solvent extracts showed that most, although not all, emitted VOCs are stored in tomato leaves (Table 1). Among the main emitted VOCs, only linalool was absent in the leaf extracts. By contrast, β -phellandrene, δ -2-carene, α -pinene, and (*E*)- β -caryophyllene were consistently found in leaf extracts, even in the genotypes that hardly emitted them. In addition, two apparently non-emitted phenolic compounds were present in the leaf extracts (methyl-salicylate and eugenol) though not always. The mean VOC contents across the eight genotypes were 69.3 ± 9.8 μ g g⁻¹ leaf fresh weight (range: 43.5 ± 5.6 – 95.6 ± 18.1 μ g g⁻¹) for the sum of all VOCs and 56.8 ± 8.6 μ g g⁻¹ (range 30.6 ± 4.5 – 90.3 ± 16.7 μ g g⁻¹) for the sum of main compounds (Table 1). VOC contents that were extracted from individual leaf samples were quite variable. Nevertheless, the plant's genotype had a significant effect on the VOC contents of tomato leaves ($p = 0.04$). As for emissions, this genotypic variability was mainly due to differences in monoterpene contents (ANOVA, $p = 0.002$ for the sum of monoterpenes). Especially, β -phellandrene contents were markedly different among genotypes, with lowest contents being observed for Cervil, Criolo, and Plovdiv in accordance with their emissions. The leaf concentrations of individual VOCs were hardly correlated to each other. The best correlations were observed between β -phellandrene and δ -2-carene contents ($R^2 = 0.44$), and between methyl-salicylate and δ -elemene contents ($R^2 = 0.33$; data not shown).

Table 1. VOC contents in leaf extracts ($\mu\text{g g}^{-1}$ leaf fresh weight) of the eight tomato genotypes. Data are means of 4–6 plant replicates $\pm$ SE. The sum of the four major compounds represent 70% to 95% of the sum of all stored VOCs. Other VOCs include myrcene, γ -terpinene, δ -elemene, methyl-salicylate, and eugenol. ANOVA and Kruskal Wallis statistics were used to test whether means are different among genotypes. p -values indicate the overall probability of the test results (significant if $p < 0.05$). Superscript letters indicate which of the genotypes differs at $\alpha < 0.05$.

VOC	Cervil	Criolo	Plovdiv	LA1420	LA0147	Ferum	Levovil	Stupicke	p
α -Pinene	3.9 $\pm$ 1.9	10.1 $\pm$ 1.7	1.0 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 3.2	9.0 $\pm$ 4.9	3.9 $\pm$ 1.2	6.6 $\pm$ 2.7	1.4 $\pm$ 0.6	0.101 ^{\$}
δ -2-Carene	10.4 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 2.4	6.7 $\pm$ 3.5	7.6 $\pm$ 3.8	1.4 $\pm$ 1.1	10.6 $\pm$ 4.6	7.3 $\pm$ 5.9	0.323 ^{\$}
β -Phellandrene	12.9 $\pm$ 2.7 ^a	13.5 $\pm$ 4.3 ^{ab}	13.9 $\pm$ 4.3 ^{ab}	52.2 $\pm$ 13.2 ^{ab}	30.0 $\pm$ 10.3 ^{ab}	42.9 $\pm$ 6.5 ^{ab}	57.6 $\pm$ 11.8 ^b	22.3 $\pm$ 4.8 ^{ab}	0.002 ^E
β -Carvophyllene	13.1 $\pm$ 2.3	5.9 $\pm$ 1.0	22.4 $\pm$ 9.5	5.8 $\pm$ 2.1	27.1 $\pm$ 7.8	14.3 $\pm$ 6.4	15.5 $\pm$ 4.4	13.4 $\pm$ 3.5	0.240 ^{\$}
Sum major VOCs	40.3 $\pm$ 4.0 ^a	30.6 $\pm$ 4.5 ^a	39.6 $\pm$ 14.0 ^a	73.1 $\pm$ 14.7 ^a	73.8 $\pm$ 14.3 ^a	62.5 $\pm$ 6.2 ^a	90.3 $\pm$ 16.7 ^a	44.4 $\pm$ 14.5 ^a	0.045 ^E
Sum all VOCs	44.7 $\pm$ 5.3 ^a	43.5 $\pm$ 5.6 ^a	47.5 $\pm$ 13.2 ^a	85.3 $\pm$ 16.8 ^a	95.6 $\pm$ 18.1 ^a	89.1 $\pm$ 9.3 ^a	95.0 $\pm$ 16.2 ^a	53.6 $\pm$ 15.9 ^a	0.037 ^E

^E ANOVA and Bonferroni post-hoc tests; ^{\$} Kruskal–Wallis and Dunn’s post-doc tests.

2.2. Belowground VOC Production

About 20 VOCs released from the soil surface were associated with the presence of plants, among which all of the monoterpenes and sesquiterpenes that were observed in the aboveground emissions (Figure 2, Supplementary material Table S1). In addition, methyl-salicylate and an unidentified monoterpene occurred in the soil emission, as well as various oxygenated VOCs, including dodecanal, tetradecanal, methyl-heptanone, hexanoic acid, and 3-octenol. However, the latter group of oxygenated VOCs, as well as linalool and the sesquiterpene δ -elemene, were also frequently detected in the emissions of soil blanks (without plant) indicating that a variable fraction of these VOCs emitted from the soil surface was not exclusively linked to the presence of plants. Belowground emissions, either expressed per soil surface or per root dry weight, scattered strongly among plant replicates in all genotypes. Consequently, no significant genotypic effects were observed neither for the sum of VOC emissions nor for individual VOC classes. Overall, the mean total VOC belowground emissions amounted to 4.86 ± 0.64 ($\pm$ SE, $n = 34$) ng m^{-2} ground surface s^{-1} or 0.53 ± 0.07 $\mu\text{g g}^{-1}$ root dry weight h^{-1} . There were distinct co-variations in the appearance of individual VOCs. β -Phellandrene, δ -2-carene, α -terpinene, α -phellandrene, p -cymene, and terpinolene emissions correlated well with each other ($R^2 > 0.7$). By contrast, these VOCs were only moderately correlated with the emissions of myrcene, γ -terpinene, and β -ocimene (R^2 : 0.3–0.6), and not at all with the emissions of α -pinene, linalool, sesquiterpenes, and other VOCs (Supplementary material Figure S2). Instead, the linalool soil emissions scaled positively with the emission of methyl-salicylate ($R^2 = 0.86$) and with the emissions of sesquiterpenes, especially germacrene-D ($R^2 = 0.81$), while α -pinene emissions were not related to other VOCs other than β -pinene. The variability in the VOC emission rates per soil surface were mostly unrelated to the root dry weights of the plants. Among individual VOCs, only the soil emissions of myrcene, β -ocimene, linalool, and methyl-salicylate scaled positively with root dry weights (respective R^2 discarding zero emission values: 0.75, 0.49, 0.38, 0.29; data not shown).

Analyses of root extracts revealed the presence of six VOCs in low concentrations, of which only β -phellandrene and methyl-salicylate were also found in the soil emissions. Two benzenoids phenyl-acetaldehyde and guaiacol, the acyclic monoterpene alcohol geraniol and one unidentified aldehyde, were the other stored VOCs inside roots (Table 2). The two major stored compounds, phenyl-acetaldehyde and methyl-salicylate, scaled positively with each other ($R^2 = 0.77$) and to a lesser extent with guaiacol (R^2 : 0.52 and 0.30, data not shown). There were no apparent correlations between the amounts of the other stored VOCs. As for belowground emissions, the VOC contents from root extracts were highly variable among plant replicates and, hence, no significant genotype effect could be seen from our data. On average, the total amount of VOCs stored in the roots was 2.55 ± 0.38 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW.

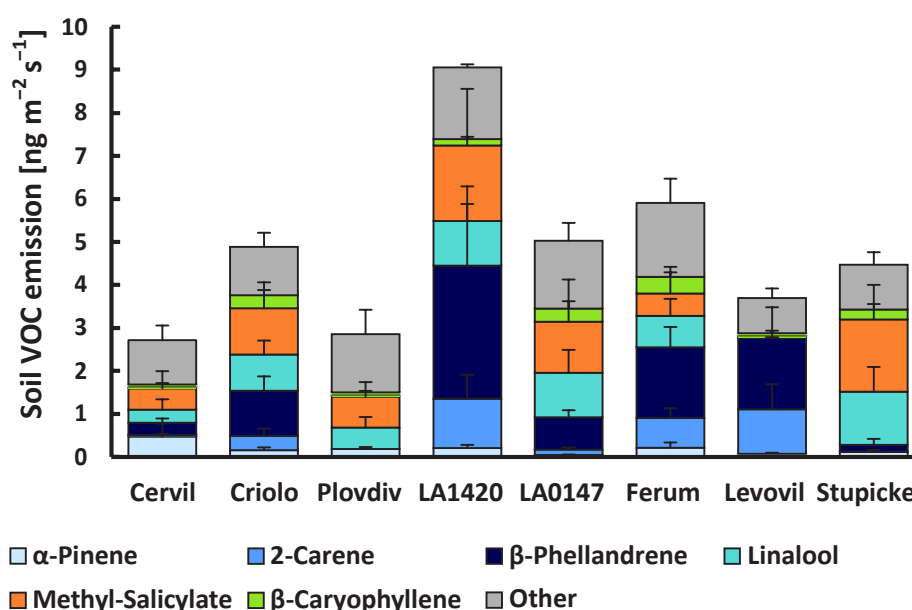


Figure 2. VOC emissions from the soil surface of the eight accessions of the MAGIC tomato population. Column sections show the mean emissions + SE ($n = 3\text{--}4$) of the six major emitted compounds and the sum of all other compounds. There was no significant difference between genotypes for individual VOCs or the sum of VOC emissions (Kruskal–Wallis tests, $p > 0.05$).

Table 2. VOC contents in root extracts ($\mu\text{g g}^{-1}$ root fresh weight) of the eight tomato genotypes. Data are means of 3–4 plant replicates $\pm$ SE. There was no significant difference between genotypes ($p > 0.05$; ANOVA on the sum of VOCs and Kruskal–Wallis tests on individual VOCs).

VOC	Cervil	Criolo	Plovdiv	LA1420	LA0147	Ferum	Levovil	Stupicke
β -Phellandrene	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.07	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.17 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Geraniol	0.35 ± 0.13	0.09 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.14	0.10 ± 0.09	0.08 ± 0.08	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Methyl-salicylate	0.66 ± 0.09	1.04 ± 0.15	0.25 ± 0.14	0.50 ± 0.06	0.64 ± 0.29	0.66 ± 0.31	2.43 ± 0.59	0.50 ± 0.03
Phenyl-acetaldehyde	1.22 ± 0.16	1.47 ± 0.20	0.10 ± 0.01	0.99 ± 0.21	2.39 ± 0.96	1.18 ± 0.64	2.96 ± 0.88	0.75 ± 0.05
Unknown aldehyde	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.17 ± 0.14	0.15 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.04
Guaiacol	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.07	0.10 ± 0.01
Sum of VOCs	2.36 ± 0.30	2.79 ± 0.59	0.52 ± 0.15	1.97 ± 0.66	3.43 ± 0.50	2.03 ± 1.04	5.87 ± 1.44	1.46 ± 0.09

2.3. Covariations between Genotypic Differences in above and Belowground VOC Production

Based on the mean values per genotype, we performed Pearson correlation analyses in order to see whether genotypic differences in the above and below ground production of VOCs were linked to each other (Table 3, Figure 3). A clear positive correlation was seen between the genotypic variations in foliar VOC emission and foliar VOC contents for the sum of all VOCs (Figure 3a) and the sum of major VOCs, especially if the genotype Levovil was left out. The correlations between contents and emissions of individual VOCs were more scattered than the sum of VOCs and β -phellandrene showed the best fit ($R^2 = 0.53$, data not shown). Using the emission data set that was obtained under dark conditions did not improve the correlations to foliar VOC contents. The mean leaf VOC contents per genotype were positively correlated with the mean CO_2 -assimilation rates per genotype (R^2 total VOCs: 0.52, R^2 major VOCs: 0.70 (Figure 3a, small inserted graph)), whereas there was no clear relationship between the genotypic differences in foliage VOC emission and CO_2 -assimilation ($R^2 < 0.3$, data not shown).

Table 3. Coefficients of determination (R^2) of Pearson correlation analyses between foliar VOC emissions, foliar VOC contents, soil VOC emissions, and root VOC contents of the 8 tomato genotypes based on the mean values of three to six replicate measurements per genotype. Correlations with $R^2 \geq 0.3$ are considered as meaningful. If correlations between genotypes were obviously biased by a single outlier, R^2 without outlier are given in parenthesis, together with the name of the genotype outlier (see also Figure 3).

Sum of All VOCs			
Foliar emission	0.73 (0.95 Levovil)	0.36	0.00
0.57 (0.89 Levovil)	Foliar content	0.25	0.30 (0.16 Levovil)
0.34 (0.61 LA0147)	0.31	Soil emission	0.00
0.04	0.43 (0.10 Levovil)	0.03 (0.23 LA1420)	Root content
Sum of major VOCs			

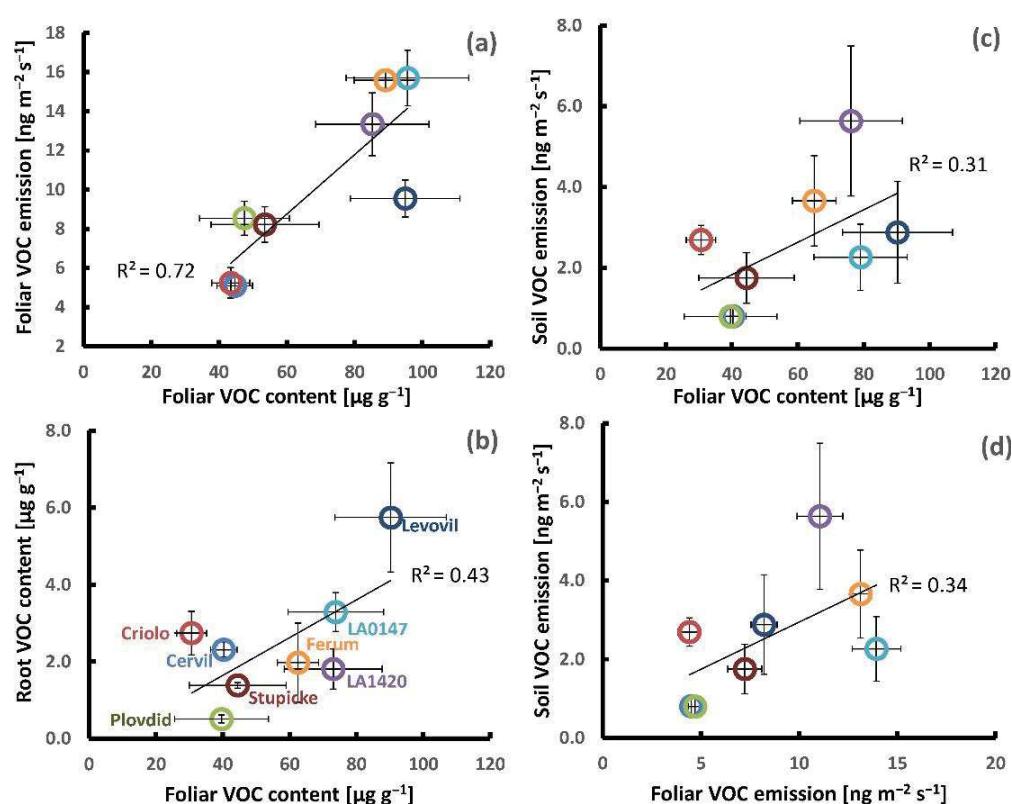


Figure 3. Examples of genotypic covariations in the aboveground and belowground VOC production of the eight parents of the MAGIC tomato population; (a–c): Foliar VOC contents vs. foliar VOC emissions, root VOC contents, and soil VOC emissions; and, (d) foliar VOC emissions vs. soil VOC emissions. The small inserted graph in (a) shows the foliar VOC contents vs. foliar CO_2 -assimilation. All of the data points represent the mean values per genotype $\pm$ SE of three to six plant replicates. Note that the belowground VOC production was determined on different plants than those used for the determination of aboveground VOC production.

The mean soil emissions per genotype were unrelated to their root VOC contents either for the sum of VOCs (Table 3) or for individual common VOCs. On the other hand, the mean soil emissions per genotype scaled weakly with mean foliar VOC emissions and contents (Table 3, Figure 3c,d). This positive relationship was mainly associated with monoterpene emissions and less with other VOC classes. Among the individual commonly emitted VOCs, the mean myrcene, *p*-cymene, and β -phellandrene aboveground emissions showed the best correlations with the respective mean belowground emissions ($R^2 = 0.75$, 0.44 and 0.43, respectively, data not shown). Further, no or only traces of β -phellandrene

and δ -2-carene were released from the soil surface of the genotypes Cervil and Plovdiv consistent with their absence in the foliar emissions. The mean VOC root contents per genotype were also uncorrelated with mean foliage emissions, while they weakly correlated with mean VOC leaf contents (R^2 : 0.30 and 0.43, Table 3). However, this correlation should be considered with caution, since it was mainly based on Levovil, showing strong VOC contents in both leaves and roots (Figure 3b). Concerning the two individual compounds stored in both organs, only the mean foliar contents of β -phellandrene were weakly correlated with the mean β -phellandrene contents in the roots (R^2 : 0.30, data not shown), whereas the mean methyl-salicylate contents in roots were unrelated to those in leaves (R^2 : 0.0 and 0.26 after the removal of Levovil, data not shown).

3. Discussion

3.1. Aboveground Emissions

The present study revealed that constitutive VOC emissions of intact tomato foliage are mainly composed of monoterpenes and a few sesquiterpenes that are only released at low rates ranging between 5 and 20 ng m⁻² s⁻¹. VOC emissions from tomato foliage have already been described in various previous studies and the composition and quantity of constitutively released VOCs reported therein are consistent with those observed in our study [4,17,20,22,26].

The majority of VOCs were emitted under both light and dark conditions and they were also found in the leaf extracts, with leaf contents roughly scaling with emission rates. This strongly suggests that emissions predominantly stem from storage pools that are localized in the glandular trichomes that cover all aboveground organs. Especially, type VI tomato trichomes produce large amounts of volatile terpenes, which are stored inside an intercellular cavity that is located in the middle of the four secretory apical cells [31]. However, the emission rates of all stored terpenes were reduced under darkness, which is unexpected if emissions are exclusively governed by the physical diffusion from the apical cavity to the atmosphere. A possible explanation of this partial light dependency is that another independent terpene source in the green tissues of tomato foliage exists, whose pool size is small and emission is directly linked to a de-novo-biosynthesis requiring photosynthetic input of primary carbon-substrates and biochemical energy. Alternatively, the partial light dependency comes from the intensive terpene production in young trichomes occurring during the growth and maturation of leaves and stems. Glandular trichomes undergo distinct developmental stages, starting from gland initiation in the presecretory stage to the secretory stage, during which the storage space is filled, followed by the postsecretory stage [32]. During the secretory stage, the cavity lining that prevents the escape of stored metabolites gradually develops, so that a considerable fraction of terpenes transported to the storage space can escape into the atmosphere. Furthermore, a light dependency of this terpene production is plausible, because Tomato type VI trichomes cells contain functional, photosynthetically active chloroplasts, whose products, along with sucrose, imported from source tissues sustain the biosynthesis of secondary metabolites [33].

If different singular terpenes come from a same source, their emissions are more likely to be correlated than if they come from different independent sources. In our study, the foliar emissions of all stored monoterpenes were correlated to each other. In particular, β -phellandrene, δ -2-carene, and α -terpinene emissions were highly correlated, which is consistent with their common production by a single tomato terpene synthase (TPS20) that is predominantly active in the plastids of young and mature leaf and stem glandular trichomes [34]. Less good, although still significant, were their correlations with the emissions of α -pinene, which is produced in the same tissues, but by another plastidic enzyme (TPS9). By contrast, none of the emissions of the main monoterpenes stored were related to the sporadic emissions of linalool. In tomato, several plastidic and cytosolic enzymes that are not predominantly expressed in young glandular trichomes can synthesize linalool [33]. Several studies have reported that linalool production is induced by biotic stress elicitors [35–38]. Ref. [35] found that induced linalool emissions from tomato foliage

followed a strict daily pattern, in agreement with the absence of linalool in dark emissions and in the leaf extracts that were observed in our study.

In summary, we conclude that, with the exception of linalool, all of the aboveground emissions of major monoterpenes were related to their constitutive production in glandular trichomes, whose light-dependent fractions presumably originated from trichomes in the intensive secretion stage that is principally present on young, immature leaf, and stem surfaces. This implies that, once trichomes enter the postsecretory stage, the stored VOCs are efficiently sealed inside the cavities and only diffuse out at tiny rates, because the fraction of young foliage present in our enclosures (ca. 20–25%) was small when compared to the degree of the emission's light dependency (ca 50% for stored monoterpenes). The tight sealing helps to preserve the trichome's integrity and, hence, ecological functions. The cavities easily break upon mechanical stress that is caused by herbivores and produce huge VOC bursts, together with sticky, non-volatile exudates that together provide a chemical (deterrent or toxic) and physical barrier against herbivore attacks [39]. The intraspecific variability we could demonstrate in the present study, most notably reduced VOC levels in the *cerasiforme* group, was almost exclusively associated with monoterpenes that are known to be constitutively formed and stored in type VI trichomes. Therefore, it is conceivable that the observed chemodiversity in foliar terpene emissions and contents is due to genotypic variation in trichome densities with possible impacts on their stress resistances [40]. The trichomes of type VI are morphologically different among tomato species, with a lower storage capacity in cultivated tomato species when compared to wild species, which are more resistant to environmental stresses [41]. However, to date, only very few studies have compared the ecological performances of the MAGIC parental genotypes although they present a wide range of phenotypes at the leaf and fruit levels [29]. Their phenotyping under contrasted conditions suggested a higher tolerance to water or salinity stress in the *cerasiforme* group [42–45]. Thus, our study brings complementary information on the genotypes related to the diversity of VOC production and emissions from vegetative organs.

To our knowledge, only one study has investigated the intraspecific chemical variability of foliar VOC emissions from tomato with a focus on salt stress effects [22]. Instead, many studies have concentrated on the varietal diversity of VOCs that are released from the tomato fruit given that fruit aroma is an important component of quality [46–48]. Generally, the fruit volatile bouquet of tomato is mainly composed of derivatives of amino acids, fatty acids and carotenoids, whereas monoterpenes and sesquiterpenes are almost absent. This clear difference in the VOC production of tomato plant organs underlines their different ecological functions as attractants and repellents, which is also reflected in distinct human olfactory sensations perceiving the scent of tomato fruit to be pleasant and the odor of tomato leaves as unpleasant. Interestingly, [49] compared the flavor contents of Cervil and Levovil fruits and reported distinct higher eugenol levels in Levovil than in Cervil, which was consistent with the different leaf contents observed in our study.

3.2. Belowground Emissions

To date, volatile emissions from tomato roots have rarely been investigated. Ref. [50] collected VOCs from dissected frozen tomato roots and detected few terpenes in addition to methyl-salicylate and pyrazine-derivatives. More recently, [51] employed a headspace technique that was combined with passive VOC sampling on adsorbent cartridges to investigate VOC release from intact tomato roots in soil. These authors detected a wealth of alkanes, alkenes, ketones, acids, phenolic, and unidentified compounds, plus several monoterpenes, but no sesquiterpene. However, both of the studies did not quantify the emission rates. In our study, the total amount of VOCs released from the soil surface varied between 1 and 10 ng s^{−1} m^{−2}, with terpenes contributing more than half (monoterpenes, 52%; sesquiterpenes, 6%). An increasing body of literature is available on VOC fluxes from forest soils and, to a lesser extent, from agricultural soils (for an overview, see e.g., [52–54]). Monoterpene soil emissions were regularly recorded in ecosystems with

terpene storing litter covering the ground. For example, in conifer forests, the reported emission rates vary between one-tenth and several hundreds of $\text{ng s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ground surface, depending on the forest and soil type, the amount and decomposition state of the litter, and the environmental conditions ([55], and references therein). The soil emission rates that we gained from potted plants fall in the same range, although no litter was present on the soil surfaces. Nevertheless, our observations indicate that the VOC emissions from the soil were partly associated with the aboveground VOC production of tomato plants: many VOCs emitted from the soil were found in the foliar VOC emissions and VOC leaf extracts, but not in the root extracts, and their emission rates varied independent of the root biomass of the plant replicate. In addition, the genotypic variation in soil VOC emissions was unrelated to the genotypic variation in root VOC contents, while it was weakly correlated with foliar VOC emissions and contents. On the other hand, the mean root VOC contents scaled positively with their foliar contents pointing to an inherent link between the plant's capacity to produce VOCs in belowground and aboveground organs. Indeed, β -phellandrene and methyl-salicylate emitted from the soil were found in both root and leaf extracts. Furthermore, the individual soil emission rates of methyl salicylate as well as that of all acyclic monoterpenes (myrcene, ocimene, linalool), were correlated with the root biomass of the plants, implying a root origin, especially when considering that the correlations between emissions from the root and from the soil surface have been likely weakened by unknown VOC retentions and transformations that occurred during path through the soil [10].

Thus, our findings let us conclude that VOC emitted from the soil surface consisted of a mix of volatiles that are derived from both above and belowground sources. Links between soil emissions and aboveground VOC production can be explained by VOC contamination of the upper soil layer by formerly decaying leaves (cotyledons) or disruption of glandular trichomes during plant handling and the subsequent adsorption of gaseous VOCs on soil particles or dissolution on aqueous surfaces. Furthermore, VOCs or their precursors might be transported between the above and belowground organs via the sap flow [56,57]. In addition to these aboveground VOC sources, soil emission also included VOCs originating from root production having no or only small pool sizes when compared to the aboveground organs. There is increasing evidence that roots and their associated microbiota exchange volatile metabolites that shape interactions with other soil organisms [10] and even affect root development, possibly by altering stress signaling [58]. The VOCs that are produced by roots can be similar to those produced by other organs or they can be organ specific. For example, isoprene, a major plant VOC typically formed in leaves of poplar, is also produced by roots albeit at much lower rates than in leaves [59]. In tomato, [34] analyzed the terpene profiles of different tissues and reported relatively high amounts of geraniol and β -phellandrene in roots, which coincides with the terpenes are that present in our root extracts. A large number of terpene synthases are expressed in tomato roots, although their putative products are not always detectable in root tissues [34,60]. According to our soil emission data, one or several of them produce acyclic monoterpenes without relevant accumulation in root tissues.

3.3. Implications for Crop Surveillance

Most of the tomato production that is intended for the consumption of fresh fruits is grown in greenhouses. Innovative methods for early disease detection in crop survey are needed to foster environmentally and human-friendly agriculture. Online monitoring of VOC exchanges from crops might be a promising tool, especially in greenhouse culture, where environmental drivers affecting the atmospheric VOC load are considerably reduced and more controlled than in outdoor conditions. Several pilot studies have already endeavored to develop this application in tomato culture [16,18,19], and our results confirm the suitability of this crop as a model species: constitutive emissions from tomato foliage are very low under undisturbed conditions, i.e., one to three orders of magnitude lower than those of other typical monoterpene emitting vegetation, such as conifers and Mediter-

ranean oak species [61]. The two main compounds β -phellandrene and δ -2-carene do not figure among the monoterpenes that are commonly observed in the air [62]. Therefore and because the trichome cavities wherein these compounds are stored can easily break, any increase in the greenhouse air concentrations outside cultural practices can indicate the presence of pests, in particular chewing arthropods and necrotrophic pathogens [20,63].

However, our results revealed several issues that can interfere with the interpretation of temporal variations in constitutive VOC pattern. First, we observed clear quantitative and qualitative differences between the foliage emissions of the eight genotypes. Cherry tomato accessions tended to have lower emission capacities and two of them mainly released pinenes, which are commonly found in the atmosphere. Thus, the suitability and usefulness of VOC monitoring in tomato culture can depend on the cultivar. Second, besides temperature, light was identified as an environmental factor driving temporal changes in VOC emissions. We hypothesized that the emissions from young immature foliage are mainly light dependent on the contrary to the emissions from mature foliage. If so, the degree of light dependency to be considered in greenhouse VOC monitoring will change during the crop cycle depending on the proportions of young and mature tissues. Finally, we found that the soil substrate, together with roots, can represent a non-negligible VOC source, since the emission rates per soil surface were almost as high as the leaf emission rates, but more variable. In addition to leaf constitutive VOCs, relatively high levels of methyl-salicylate and linalool were detected in soil emissions, both being typical stress-induced VOCs [64]. Linalool was also emitted from foliage in highly irregular amounts, possibly pointing to the presence of stress, although there was no visible sign of pests. However, our plants were grown in a non-sterile environment, so that a low presence of microorganisms eliciting some stress reactions cannot be ruled out. Further studies on belowground VOC emissions are needed in order to understand their origins and links with aboveground VOC sources to assess whether the quantities that are released under real cultural condition may blur or oppositely complement the diagnostic value of VOC markers from foliage emissions.

To conclude, our study provides new insights into the genotypic variation of constitutive VOC production in cultivated tomatoes, complementary to several previous studies that have phenotyped the MAGIC parents at the fruit level. The main purpose of this study was to correctly quantify the emissions under non-stress conditions and assess their origins and variations. It is a first essential step toward the use of VOCs for developing agro-ecological applications in greenhouse production.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

INRAE Centre for Vegetable Germplasm (CRB-Leg, Avignon, France) provided the seeds of the eight parents of the MAGIC tomato population and it grown in a glasshouse at day/night temperatures of 22/18 °C. Several batches of plants were grown regularly over the experimental period in order to have plants at a similar developmental stage all of the time. After about three weeks, individual seedlings were transferred to home-made cylindrical PVC pots of ca. 3 L volume filled with a mixture of sand and potting soil (Substrat SP178, Klasmann-Deilmann, France) and then regularly irrigated with a nutrient solution (Liquoplant Rose, 5 mL L⁻¹ deionized water). The inner walls of the pots were lined with FEP films (50 μ m thick), which were folded twice over the edge on the upper open side of the pot and fixed with a silicone sealing ring, leaving approximately 10 cm of FEP film protruding (Figure 4). Before the experiment, the protruding film was equipped with a two-way PTFE stopcock (BOLA, Bohlender GmbH, Grünsfeld, Germany) and closed around the stem base to separate the upper foliage air space from the pot with soil and roots.

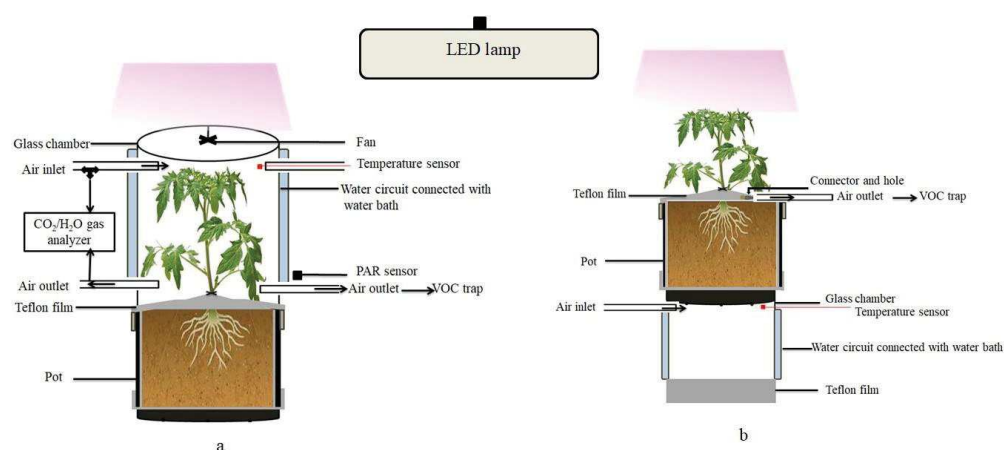


Figure 4. Schematic of the dynamic enclosure system used for the measurement of VOC emissions from the entire foliage (**a**) or from the soil surface (**b**) of tomato plants. The arrows indicate the direction of the airflow. The double walled middle section of the chamber with the temperature-regulated water circuit is shown in blue.

4.2. Enclosure System and VOC Emission Measurement Protocol

All of the measurements were made on vegetative plants of 16 to 18 cm height (about seven to eight weeks after sowing, five to six fully expanded leaves and no flowers). The VOC emissions were measured with a dynamic headspace system operating two identical glass chambers fixed on a lifting platform side-by-side (for further description see [65]). Each chamber consisted of an open double walled glass cylinder of 16 cm diameter (same diameter as the pots) and 21 cm height (volume 4.2 L) featuring six inlet/outlet ports to the inner air space plus two ports to circulate thermostatic water from a water-bath inside the double glass wall (Figure 4). The chambers were closed on the top by removable glass lids holding a Teflon fan (motor outside) to ensure the homogenous mixing of the air inside the chambers. A programmable temperature controller regulated constantly the temperature of the water bath to a target air temperature of 30 °C measured by an inserted thermocouple (Chrom-Constantan, OMEGA, Biel, Switzerland). Additional thermocouples were mounted in order to survey the chamber air temperatures. Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) was measured by two quantum sensors (LI-COR, PAR-SB 190, Lincoln, NE, USA) fixed outside the chambers. A LED lamp (LX60 Heliospectra AB, Göteborg, Sweden) illuminated the chambers with a PPFD of $600 \pm 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Temperature and PPFD data were recorded by a 21X Campbell data logger (Campbell Scientific Ltd., Shepsherd, UK).

For measuring the aboveground emissions (Figure 4a), the plants were mounted inside the open chambers (lids removed) in the evening the day before VOC measurements. The lower border of the glass chamber was precisely placed on the upper border of the pot and sealed outside with a silicone O-ring. The plants remained in the open chambers overnight at room temperature in order to ensure that any VOC emission bursts that were caused by the handling were gone [25]. The plants were illuminated with a program simulating sunset and sunrise with respect to outdoor conditions. The next day, chambers were flushed with artificial dry air (Alphagaz, 2 Air, Paris, France) at a constant rate of 1 L min^{-1} regulated by mass flow controllers (Mass Stream, M + W Instruments GmbH, Leonhardsbuch, Germany). Next, the chambers were closed, the air temperature was set to 30 °C and pure CO_2 (Air liquid, CO_2 N45) was injected in the inlet air stream via high precision mass flow controllers (El-Flow Select, Bronkhorst France SAS, Montigny-les-Cormeilles, France) to achieve CO_2 concentrations of 400 ± 20 ppm inside the chambers. If necessary, the air was humidified by passing an adjustable fraction of the dry artificial air via a bypass through a gas washing bottle filled with distilled water in order to maintain a relative air humidity between 60% and 70%. The CO_2 and H_2O concentrations of the air entering and leaving the chambers were continuously monitored with infrared gas analyzers (LI-COR 7000 combined with LI-COR 840, Lincoln, NE, USA). The VOC

emissions were measured after an acclimatization period a 90 min. VOCs were sampled on stainless steel cartridges (Perkin Elmer, Villebon, France) containing porous adsorbing polymers of Tenax TA and Carbotrap B in about equal quantities. The cartridges were connected to the chamber inlet and outlet ports and air was drawn through the adsorbent for 40 min at a constant flow rate of 150 mL min^{-1} by means of a pump and a mass flow controller. After this first measurement under light conditions, the lamp was turned off and the chambers were covered with a black sheet to determine VOC emissions under dark conditions. The temperature and CO_2 concentrations were maintained at the same levels and VOCs were sampled after acclimation, as previously described. Subsequently, the plants were removed from the chambers and the foliage was collected in order to determine the VOC contents, total leaf dry masses, and surfaces. The leaf surface was determined by scanning leaves (Epson perfection V800) and processing the scans with Image J5 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The foliar dry weights were measured with a microbalance (Sartorius CP224S) after oven-drying at 60°C for 72 h.

For measuring the belowground emissions (Figure 4b), the following protocol was applied: the pots with plants (different replicates than those used for foliage emission measurements) were mounted on the top of the open chambers (lids removed), while the open chamber bottom was closed with a sheet of FEP film hold by a silicon O-ring in order to ensure that only pure artificial air diffuses through the soil via the drain hole at the bottom of the pots. Air temperature and CO_2 concentrations were adjusted to 30°C and 400 ppm, respectively. After acclimation, an adsorbent cartridge was connected to the two-way PTFE stopcock inserted in the FEP film enclosing the headspace above the soil and VOCs were sampled at a flow rate of 150 mL min^{-1} for 60 min. The belowground emissions were measured once per plant replicate under illuminated conditions. Afterwards, roots were harvested to determine their VOC contents and dry weights.

In order to account for VOC background of the headspace system, VOC measurements were carried out using pots that were filled with substrate, but without plants, according to the same protocols as for plant aboveground and belowground emission determination.

4.3. Solvent Extraction of VOCs Stored in Leaves and Roots

The VOC contents were measured following the method that was described in [66]. Briefly, representative leaflets or root sections of each plant were carefully detached with a pair of scissors and plunged in 10 mL of dichloromethane after weighing the fresh sample on a microbalance (average fresh weights of leaves and roots were around 350 and 900 mg, respectively). The solution was inserted in an ultrasonic water bath for ten minutes, briefly vortexed, and then left for an hour at room temperature to complete extraction. Next, the plant material was removed from the extract and the extract was concentrated to a volume of approximately 250 μL in a flow of pure nitrogen after adding an internal standard of 40 μL biphenyl (0.1 mg mL^{-1}).

4.4. GC-MS Analysis of VOC Emissions and Contents

VOCs that were sampled on adsorbent cartridges were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) while using a Shimadzu QP-2010-SE instrument equipped with a TD-20 thermal desorption system (Shimadzu, Kyoto, Japan). Directly before analysis, cartridges were pre-purged for 5 min with pure nitrogen (flow rate ca. 30 mL min^{-1}) to remove excessive water and were then thermally desorbed by flushing the heated tubes at 250°C for 10 min with carrier gas (helium) at a rate of 30 mL min^{-1} . The desorbed VOCs were trapped at -10°C on a low-dead-volume cold trap containing a small amount of Tenax-TA. After desorption, condensed VOCs were thermally injected into the column by flush heating the cold trap to 250°C for 5 min. The VOCs were separated on an Optima 5 MS column (length: 30 m, ID: 0.25 mm, FT: 0.25 μm ; Macherey-Nagel, Düren, Germany) while using the following oven program: 2 min. at 40°C , 5°C min^{-1} to 200°C , $10^\circ\text{C min}^{-1}$ to 250°C , kept for 4 min.

Analyses of solvent extracts were carried out with a Shimadzu GC-MS QP-2010-Plus that was equipped with the same column. An aliquot of 1 μL of the concentrated extracts was injected with a split ratio of 1:4 and the oven was run with the following temperature program: 40 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 3.2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 100 $^{\circ}\text{C}$, 2.90 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 170 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$, held for 6 min.

GC-MS both used helium as carrier gas at a constant flow of 1 mL min^{-1} . Transfer lines were kept at 200 $^{\circ}\text{C}$ and ion sources at 250 $^{\circ}\text{C}$. MS acquisition was operated in scan mode (m/z range: 35–350), applying an ionization energy of 70 eV. The peaks were identified by comparing their retention indices and mass spectra with those of commercial databases (NIST 2005, Wiley 2009, Adams, 2005, supplementary data Table S1) as well as pure standards dissolved in methanol (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany). Standard solutions of various VOCs at three dilution levels were used in order to quantify emissions, namely α -pinene, *p*-cymene, linalool, methyl-salicylate, acetophenone, geranyl acetone, α -humulene, β -caryophyllene, octanal, and decanal. The calibration factor (peak area ng^{-1}) of each VOCs was deduced from the slope of multipoint calibrations, revealing a good linear dependency of peak area to the respective compound amount. The mean calibration factor per compound class (i.e., monoterpenoids, sesquiterpenoids, phenolic compounds, and aldehydes) were applied to quantify the peaks identified in one of these classes, and the mean calibration factor of all the standards was applied to peaks to unidentified peaks.

The quantification of leaf and root VOC contents (solvent extracts) was exclusively based on the amount of the internal standard biphenyl, in order to take the losses of VOCs occurring during the concentration step into account.

4.5. Calculations and Statistical Analyses

Net CO_2 -assimilation, transpiration, and stomatal conductance of the enclosed foliage were calculated according to [67]. The foliage VOC emissions were calculated as the difference between the VOC concentrations in the chamber with plant and the concentration in the empty chamber, multiplied by the chamber air flow (1 L min^{-1}) and divided by either the projected area or the dry weight of the enclosed foliage. In analogy, emissions from belowground organs were calculated as the difference between the VOC concentrations in the above soil headspace with plant and the concentration in the above soil headspace without plant, multiplied by the air exchange rate, which was assumed to be equal to the VOC sampling flow rate (i.e., 0.15 L min^{-1}). The belowground emissions were expressed either per ground surface (pot cross-sectional area) or per root dry mass. Hence, the belowground emissions that are reported in our study do not represent true root emissions, but characterize the net VOC exchange at the soil-air interface associated with the presence of the plants.

Statistical analyses were carried out while using XLSTAT statistical software (v.7.0, Addin soft, Paris, France). The normality and homogeneity of data were assessed by the Shapiro-Wilk and Levene test. If the data showed normality and homogeneity, then the genotype effect was tested with a one-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple pairwise comparison; otherwise, the non-parametric Kruskal–Wallis test combined with a Dunn test was applied. Paired Student tests or Wilcoxon signed-rank tests were used for the comparison of VOC emissions under light and dark. The differences between groups of measured variables were considered to be significant at a probability level of $p < 0.05$. Pearson correlation analyses were performed in order to test the covariation among variables. Consistency of correlations was visually checked by scatter plots. Correlations with a coefficient of determination $R^2 > 0.6$ (more than 60% of covariation explained) are denoted as strong and those with $0.3 < R^2 < 0.6$ as weak. Correlations with $R^2 < 0.3$ are considered to be meaningless.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Examples of correlations between individual VOCs emitted by tomato foliage, Figure S2: Examples of relations among soil emissions of individual VOCs, Table S1: List of VOCs analyzed by GC-MS that were observed either in the emissions from foliage and/or soil and/or in the extracts of leafs and/or roots, Table S2: Foliar

emission rates of VOCs measured under light and dark conditions on the eight parents of the tomato MAGIC population.

Author Contributions: Conceptualization, M.S. & N.B.; Methodology, M.S. & B.B.; Investigation, N.D.; Formal Analysis, N.D., B.B., M.S. & N.B.; Writing—Original Draft Preparation, N.D. & M.S.; Writing—Review & Editing, M.S., N.B. & N.D.; Supervision: M.S. & N.B.; Funding Acquisition, N.D. & M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study received financial support by the project “ODORSCAPE” of the French National Research Agency (ANR15-CE02-010-01) and the LabEx CeMEB (ANR-10-LABX-04-01), and ND a grant from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Data Availability Statement: Data are available from the authors on request.

Acknowledgments: We thank Beatrice Brunel, David Degueldre and Pauline Durbin for their valuable technical assistances and the INRAE unit GAFL for providing the seeds of the MAGIC parental accessions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not available.

References

- Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J.K.; Kaplan, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **2013**, *198*, 16–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Niinemets, Ü.; Kännaste, A.; Copolovici, L. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Staudt, M.; Jackson, B.; El-Aouni, H.; Buatois, B.; Lacroze, J.-P.; Poessel, J.-L.; Sauge, M.-H. Volatile organic compound emissions induced by the aphid *Myzus persicae* differ among resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative. *Tree Physiol.* **2010**, *30*, 1320–1334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pazouki, L.; Kanagendran, A.; Li, S.; Kännaste, A.; Memari, H.R.; Bichele, R.; Niinemets, Ü. Mono- and sesquiterpene release from tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves upon mild and severe heat stress and through recovery: From gene expression to emission responses. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *132*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Turlings, T.C.J.; Erb, M. Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annu. Rev. Entomol.* **2018**, *63*, 433–452. [\[CrossRef\]](#)
- Erb, M. Volatiles as inducers and suppressors of plant defense and immunity- origins, specificity, perception and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *44*, 117–121. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, W.; Gfeller, V.; Erb, M. Root volatiles in plant-plant interactions II: Root volatiles alter root chemistry and plant-herbivore interactions of neighboring plants. *Plant Cell Environ.* **2019**, *42*, 1964–1973. [\[CrossRef\]](#)
- Crombie, A.T.; Larke-Mejia, N.L.; Emery, H.; Dawson, R.; Pratscher, J.; Murphy, G.P.; McGenity, T.J.; Murrell, J.C. Poplar phyllosphere harbors disparate isoprene-degrading bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 13081–13086. [\[CrossRef\]](#)
- Massalha, C.; Korenblum, H.; Tholl, D.; Aharoni, A. Small molecules below-ground: The role of specialized metabolites in the rhizosphere. *Plant J.* **2017**, *90*, 788–807. [\[CrossRef\]](#)
- Ehlers, B.K.; Berg, M.P.; Staudt, M.; Holmstrup, M.; Glasius, M.; Ellers, J.; Tomiolo, S.; Madsen, R.B.; Slotsbo, S.; Penuelas, J. Plant secondary compounds in soil and their role in belowground species interactions. *Trends Ecol. Evol.* **2020**, *35*, 716–730. [\[CrossRef\]](#)
- Cui, S.; Inocente, E.A.A.; Acosta, N.; Keener, H.M.; Zhu, H.; Ling, P.P. Development of fast E-nose system for early-stage diagnosis of aphid-stressed Tomato plants. *Sensors* **2019**, *19*, 3480. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bsaibes, S.; Piel, F.; Gros, V.R.; Truong, F.O.; Lafouge, F.; Ciuraru, R.; Buysse, P.; Kammer, J.; Loubet, B.; Staudt, M. Monoterpene chemical speciation with high time resolution using a fast GC/PTR-MS: Results from the COV3ER experiment on *Quercus ilex*. *Atmosphere* **2020**, *11*, 690. [\[CrossRef\]](#)
- Jansen, R.M.C.; Wildt, J.; Kappers, I.F.; Bouwmeester, H.J.; Hofstee, J.W.; van Henten, E.J. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 157–174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ripoll, J.; Urban, L.; Staudt, M.; Lopez-Lauri, F.; Bidet, L.P.R.; Bertin, N. Water shortage and quality of fleshy fruits—Making the most of the unavoidable. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 4097–4117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Niederbacher, B.; Winkler, J.B.; Schnitzler, J.P. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 5403–5416. [\[CrossRef\]](#)
- Jansen, R.M.C.; Hofstee, J.W.; Wildt, J.; Vanthoor, B.H.E.; Verstappen, F.W.A.; Takayama, K.; Bouwmeester, H.J.; van Henten, E.J. Health monitoring of plants by their emitted volatiles: A model to predict the effect of *Botrytis cinerea* on the concentration of volatiles in a large-scale greenhouse. *Biosyst. Eng.* **2010**, *106*, 37–47. [\[CrossRef\]](#)
- Jansen, R.M.C.; Miebach, E.; Kleist, E.J.; van Henten, E.J.; Wildt, J. Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of *Botrytis cinerea*-induced stress. *Plant Biol.* **2009**, *11*, 859–868. [\[CrossRef\]](#)

18. Jansen, R.M.C.; Hofstee, J.W.; Wildt, J.; Verstappen, F.W.A.; Bouwmeester, H.J.; Posthumus, M.A.; Henten, E.J. Health monitoring of plants by their emitted volatiles: Trichome damage and cell membrane damage are detectable at greenhouse scale. *Ann. Appl. Biol.* **2009**, *154*, 441–452. [\[CrossRef\]](#)
19. Takayama, K.; Jansen, R.M.C.; van Henten, E.J.; Verstappen, F.W.A.; Bouwmeester, H.J.; Nishina, H. Emission index for evaluation of volatile organic compounds emitted from tomato plants in greenhouses. *Biosyst. Eng.* **2012**, *113*, 220–228. [\[CrossRef\]](#)
20. Kasal-Slavik, T.; Eschweiler, J.; Kleist, E.; Mumm, R.; Goldbach, H.E.; Schouten, A.; Wildt, J. Early biotic stress detection in tomato (*Solanum lycopersicum*) by BVOC emissions. *Phytochemistry* **2017**, *144*, 180–188. [\[CrossRef\]](#)
21. Raghava, T.; Ravikumar, P.; Hegde, R.; Kush, A. Spatial and temporal volatile organic compound response of select tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. *Plant Sci.* **2010**, *179*, 520–526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Tomescu, D.; Sumalan, R.; Copolovici, L.; Copolovici, D. The influence of soil salinity on volatile organic compounds emission and photosynthetic parameters of *Solanum lycopersicum* L. varieties. *Open Life Sci.* **2017**, *12*, 135–142. [\[CrossRef\]](#)
23. Schilmiller, A.; Shi, F.; Kim, J.; Charbonneau, A.L.; Holmes, D.; Daniel Jones, A.; Last, R.L. Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines. *Plant J.* **2010**, *62*, 391–403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Galdon-Armero, J.; Arce-Rodriguez, L.; Downie, M.; Li, J.; Martin, C. A Scanning electron micrograph-based resource for identification of loci involved in epidermal development in tomato: Elucidation of a new function for the mixta-like transcription factor in leaves. *Plant Cell* **2020**, *32*, 1414–1433. [\[CrossRef\]](#)
25. Niinemets, Ü.; Kuhn, U.; Harley, P.C.; Staudt, M.; Arneth, A.; Cescatti, A.; Ciccioli, P.; Copolovici, L.; Geron, C.; Guenther, A.; et al. Estimation of isoprenoid emission capacity from enclosure studies: Measurements, data processing, quality and standardized measurement protocols. *Biogeosciences* **2011**, *8*, 2209–2246. [\[CrossRef\]](#)
26. Copolovici, L.; Kannaste, A.; Pazouki, L.; Niinemets, Ü. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *J. Plant Physiol.* **2012**, *169*, 664–672. [\[CrossRef\]](#)
27. Bruce, T.J. Variation in plant responsiveness to defense elicitors caused by genotype and environment. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 3–6. [\[CrossRef\]](#)
28. Clavijo McCormick, A. Can plant–natural enemy communication withstand disruption by biotic and abiotic factors? *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 8569–8582. [\[CrossRef\]](#)
29. Pascual, L.; Desplat, N.; Huang, B.E.; Desgroux, A.; Bruguier, L.; Bouchet, J.-P.; Le, Q.H.; Chauchard, B.; Verschave, P.; Causse, M. Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 565–577. [\[CrossRef\]](#)
30. Ranc, N.; Muñoz, S.; Santoni, S.; Causse, M.A. Clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (*Solanaceae*). *BMC Plant Biol.* **2008**, *8*, 130. [\[CrossRef\]](#)
31. Schilmiller, A.L.; Schauvinhold, I.; Larson, M.; Xu, R.; Charbonneau, A.L.; Schmidt, A.; Wilkerson, C.; Last, R.L.; Pichersky, E. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10865–10870. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Tissier, A.; Morgan, J.A.; Dudareva, N. Plant volatiles: Going ‘In’ but not ‘Out’ of trichome cavities. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 930–938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Balcke, G.U.; Bennewitz, S.; Bergau, N.; Athmer, B.; Henning, A.; Majovsky, P.; Jimenez-Gomez, J.M.; Hoehenwarter, W.; Tissier, A. Multi-omics of tomato glandular trichomes reveals distinct features of central carbon metabolism supporting high productivity of specialized metabolites. *Plant Cell.* **2017**, *29*, 960–983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Zhou, F.; Pichersky, E. The complete functional characterization of the terpene synthase family in tomato. *New Phytol.* **2020**, *226*, 1341–1360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Maes, K.; Debergh, P.C. Volatiles emitted from in vitro grown tomato shoots during abiotic and biotic stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2003**, *75*, 73–78. [\[CrossRef\]](#)
36. Ament, K.; Kant, M.R.; Sabelis, M.W.; Haring, M.A.; Schuurink, R.C. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 2025–2037. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Kant, M.R.; Ament, K.; Sabelis, M.W.; Haring, M.A.; Schuurink, R.C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 483–495. [\[CrossRef\]](#)
38. Van Schie, C.C.N.; Haring, M.A.; Schuurink, R.C. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol. Biol.* **2007**, *64*, 251–263. [\[CrossRef\]](#)
39. Escobar-Bravo, R.; Ruijgrok, J.; Kim, H.K.; Grosser, K.; Van Dam, N.M.; Klinkhamer, P.G.L.; Leiss, K.A. Light intensity-mediated induction of trichome-associated allelochemicals increases resistance against thrips in tomato. *Plant Cell Physiol.* **2018**, *59*, 2462–2475. [\[CrossRef\]](#)
40. Keskin, N.; Kumral, N.A. Screening tomato varietal resistance against the two-spotted spider mite [*Tetranychus urticae* (Koch)]. *Int. J. Acarol.* **2015**, *41*, 300–309. [\[CrossRef\]](#)
41. Bennewitz, S.; Bergau, N.; Tissier, A. QTL Mapping of the shape of type VI glandular trichomes in tomato. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Ripoll, J.; Urban, L.; Bertin, N. The potential of the MAGIC TOM parental accessions to explore the genetic variability in tomato acclimation to repeated cycles of water deficit and recovery. *Front. Plant Sci.* **2016**, *6*, 1172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

43. Albert, E.; Gricourt, J.; Bertin, N.; Bonnefoi, J.; Pateyron, S.; Tamby, J.P.; Bitton, F.; Causse, M. Genotype by watering regime interaction in cultivated tomato: Lessons from linkage mapping and gene expression. *Theor. Appl. Genet.* **2016**, *129*, 395–418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Diouf, I.A.; Derivot, L.; Bitton, F.; Pascual, L.; Causse, M. Water deficit and salinity stress reveal many specific QTL for plant growth and fruit quality traits in tomato. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 279. [\[CrossRef\]](#)
45. Diouf, I.; Albert, E.; Duboscq, R.; Santoni, S.; Bitton, F.; Gricourt, J.; Causse, M. Integration of QTL, transcriptome and polymorphism studies reveals candidate genes for water stress response in tomato. *Genes* **2020**, *11*, 900. [\[CrossRef\]](#)
46. Goulet, C.; Mageroy, M.H.; Lam, N.B.; Floystad, A.; Tieman, D.M.; Klee, H.J. Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19009–19014. [\[CrossRef\]](#)
47. Rambla, J.L.; Tikunov, Y.M.; Monforte, A.J.; Bovy, A.G.; Granel, A. The expanded tomato fruit volatile landscape. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 4613–4623. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhang, J.; Zhao, J.; Xu, Y.; Liang, J.; Chang, P.; Yan, F.; Li, M.; Liang, Y.; Zou, Z. Genome-wide association mapping for tomato volatiles positively contributing to tomato flavor. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1042. [\[CrossRef\]](#)
49. Birtić, S.; Ginies, C.; Causse, M.; Renard, C.M.G.C.; Page, D. Changes in volatiles and glycosides during fruit maturation of two contrasted tomato (*Solanum lycopersicum*) lines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 591–598. [\[CrossRef\]](#)
50. Murungi, L.K.; Kirwa, H.; Coyne, D.; Teal, P.E.A.; Beck, J.J.; Torto, B. Identification of key root volatiles signaling preference of Tomato over Spinach by the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 7328–7336. [\[CrossRef\]](#)
51. Gulati, S.; Ballhausen, M.-B.; Kulkarni, P.; Grosch, R.; Garbeva, P. A non-invasive soil-based setup to study tomato root volatiles released by healthy and infected roots. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12704. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Penuelas, J.; Asensio, D.; Tholl, D.; Wenke, K.; Rosenkranz, M.; Piechulla, B.; Schnitzler, J.P. Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 1866–1891. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Tang, J.; Schurgers, G.; Rinnan, R. 2020. Process understanding of soil BVOC fluxes in natural ecosystems: A review. *Rev. Geophys.* **2020**, *57*, 966–986. [\[CrossRef\]](#)
54. Abis, L.; Loubet, B.; Ciuraru, R.; Lafouge, F.; Houot, S.; Nowak, V.; Tripied, J.; Dequiedt, S.; Maron, P.A.; Sadet-Bourgeteau, S. Reduced microbial diversity induces larger volatile organic compound emissions from soils. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Staudt, M.; Byron, J.; Piquemal, K.; Williams, J. Compartment specific chiral pinene emissions identified in a Maritime pine forest. *Sci. Total Environ.* **2019**, *654*, 1158–1166. [\[CrossRef\]](#)
56. Maruri-López, I.; Aviles-Baltazar, N.Y.; Buchala, A.; Serrano, M. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 423. [\[CrossRef\]](#)
57. Duan, Q.; Bonn, B.; Kreuzwieser, J. Terpenoids are transported in the xylem sap of Norway spruce. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 1766–1778. [\[CrossRef\]](#)
58. Ditengou, F.A.; Müller, A.; Rosenkranz, M.; Felten, J.; Lasok, H.; van Doorn, M.M.; Legué, V.; Palme, K.; Schnitzler, J.-P.; Polle, A. Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6279. [\[CrossRef\]](#)
59. Van Doorn, M.M.; Merl-Pham, J.; Ghirardo, A.; Fink, S.; Polle, A.; Schnitzler, J.-P.; Rosenkranz, M. Root isoprene formation alters lateral root development. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 2207–2223. [\[CrossRef\]](#)
60. Falara, V.; Akhtar, T.A.; Nguyen, T.T.H.; Spyropoulou, E.A.; Bleeker, P.M.; Schauvinhold, I.; Matsuba, Y.; Bonini, M.E.; Schillmiller, A.L.; Last, R.L.; et al. The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 770–789. [\[CrossRef\]](#)
61. Kesselmeier, J.; Staudt, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *J. Atmos. Chem.* **1999**, *33*, 23–88. [\[CrossRef\]](#)
62. Williams, J.; Yassaa, N.; Bartenbach, S.; Lelieveld, J. Mirror image hydrocarbons from Tropical and Boreal forests. *Atmos. Chem. Phys.* **2007**, *7*, 973–980. [\[CrossRef\]](#)
63. Gosset, V.; Harmel, N.; Gobel, C.; Francis, F.; Haubruge, E.; Wathélet, J.-P.; du Jardin, P.; Feussner, I.; Fauconnier, M.-L. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1231–1240. [\[CrossRef\]](#)
64. Clavijo McCormick, A.; Unsicker, S.B.; Gershenzon, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 303–310. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Daussy, J.; Staudt, M. Do future climate conditions change volatile organic compound emissions from *Artemisia annua*? Elevated CO₂ and temperature modulate actual VOC emission rate but not its emission capacity. *Atmos. Environ.* **2020**, *7*, 100082. [\[CrossRef\]](#)
66. Staudt, M.; Bourgeois, I.; Al Halabi, R.; Song, W.; Williams, J. New insights into the parametrization of temperature and light responses of mono- and sesquiterpene emissions from Aleppo pine and rosemary. *Atmos. Environ.* **2017**, *152*, 212–221. [\[CrossRef\]](#)
67. Von Caemmerer, S.F.; Farquhar, G.D. Some relationships between the biogeochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **1981**, *153*, 376–387. [\[CrossRef\]](#)

CHAPITRE II

**Identification et quantification des
émissions de COV constitutives des
parents sauvages et de leurs mutants
chez la tomate- Etude morphologique
et histochimique des trichomes-
Localisation des principaux COV dans
les trichomes**

CHAPITRE II

Ce chapitre a pour objectif d'analyser la variabilité de la morphologie et composition des trichomes de tomate qui jouent un rôle particulièrement important dans le stockage/émission des COV. Le criblage des émissions de COV des 8 parents de la population MAGIC-Tom (chapitre 1) a montré une différence des émissions des COV entre les 8 génotypes, principalement entre les deux accessions. Cependant, on a constaté que ces génotypes n'étaient pas assez contrastés, principalement au sein des accessions, pour permettre d'analyser le rôle des COV dans la résistance ou la sensibilité des plantes à l'O₃ qui était le cœur de mon sujet. Nous avons donc retenu seulement les deux génotypes les plus distincts en quantité de COV émis: Cervil et LA0147. Nous avons ajouté 6 autres génotypes (3 parents et 3 mutants) afin d'analyser les différences d'émissions de COV et de teneurs constitutives liées à la mutation. D'autre part, j'ai réalisé une étude morphologique et histochimique des trichomes pour analyser l'origine des émissions et du stockage des COV. Enfin j'ai tenté de localiser l'emplacement de certains COV majeurs dans les trichomes glandulaires.

Ces 6 génotypes nouveaux sont : i) le parent sauvage Castelmart et un mutant Odorless dont la mutation a altéré la composition d'un type de trichome glandulaire (type VI, qui représente la source majeure des COV chez la tomate). Ces deux génotypes ont été choisis afin de tester l'importance du dépôt d'O₃ chimique dans la destruction de l'O₃, et son aptitude à faire face au stress oxydatif ; ii) Un parent sauvage Ailsa craig et son mutant hairless GCR337, qui présente une densité de trichomes glandulaires faible par rapport à son parent sauvage; iii) un parent sauvage Maofen B02 et son mutant Maofen B02 qui présente une densité des trichomes non glandulaires très élevée. Ces deux derniers couples parents/mutants ont été sélectionnés pour analyser le rôle de la densité des trichomes glandulaires et non glandulaires dans le dépôt d'O₃ et la protection des plantes contre le stress oxydatif. Une étude de Kang *et al.* (2016) sur un mutant hairless du parent Ailsa Craig, semblable au mutant qu'on a utilisé (morphologiquement) indique que le mutant présente une séquence altérée d'un gène SRA1. Le mutant Odorless du parent sauvage Castelmart a été identifié par hasard lors d'une expérience de transformation par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Kang *et al.*, 2010). Le mutant Maofen B02 n'a jamais été décrit précédemment selon nos connaissances. Les semences de Castelmart et Odorless ont été fournies par Dr. Gregg A. (Howe, East Lansing-USA). Tandis que celles des autres génotypes ont été fournies par le Centre de Ressources Génétiques de la Tomate de l'INRAE, Avignon, France (Causse *et al.*, 2013). Toutes les analyses ont été réalisées sur des plantes de 8-9 semaines après le semis, ayant 4-5 feuilles de 5-6 folioles chacune.

CHAPITRE II

La première partie de ce chapitre décrit le criblage des émissions chez ces génotypes et la seconde et troisième parties présentent les analyses morphologique et histochimique des trichomes et localisation de certains COV dans les trichomes glandulaires respectivement.

Analyses statistiques

Le test de student a été effectué pour comparer les émissions, les teneurs des COV et autres métabolites secondaires entre chaque parent et son mutant. Avant la réalisation du test, la normalité et homogénéité des distributions des résidus ont été examinées par le test shapiro-wilk et levene respectivement. Le test n'a pas été appliqué en cas d'absence totale d'une variable. En raison du nombre réduit de répétitions les différences sont considérées significatives comme suit : $P > 0.1$: non-significative, * : $P < 0.05-0.1$, les différences sont considérées comme marginalement significative, ** : $P < 0.05-0.01$, différence significative, *** $< 0.01-0.001$ très significative.

1. Criblage des émissions de COV constitutives et teneurs des parents sauvages et leurs mutants

L'analyse des émissions de COV constitutives des parents sauvages et de leurs mutants a été effectuée dans des conditions similaires à celles de la première étude pour de criblage des émissions de COV des 8 parents de MAGIC tom. Le prélèvement, l'analyse et les calculs des émissions de COV sont également similaires à ceux de la première étude (voir chapitre 1).

Les teneurs foliaires des COV ont été mesurées à une température ambiante par trempage des surfaces de feuilles dans le solvant méthyl tertiary-butyl ether (MTBE). On a choisi ce solvant pour ses propriétés d'extraction des terpènes volatils (Kang *et al.*, 2010). Trois feuilles (en moyenne 350 mg de poids frais) ont été prélevées et trempées dans 2 ml de solvant de manière à ce que seules les surfaces supérieures des feuilles (qui présentent une densité supérieure des trichomes) ont été extraites. Après 10 min de trempage, 1 μ l de biphényle a été ajouté comme standard interne à la solution. Les analyses d'extraits liquides ont été réalisées avec un GC-MS-QP2010 Plus Shimadzu équipé d'un système d'injection (même méthode que celle décrite dans le chapitre 1).

CHAPITRE II

1.1 Résultats d'analyse des émissions des COV constitutives chez les parents et leurs mutants

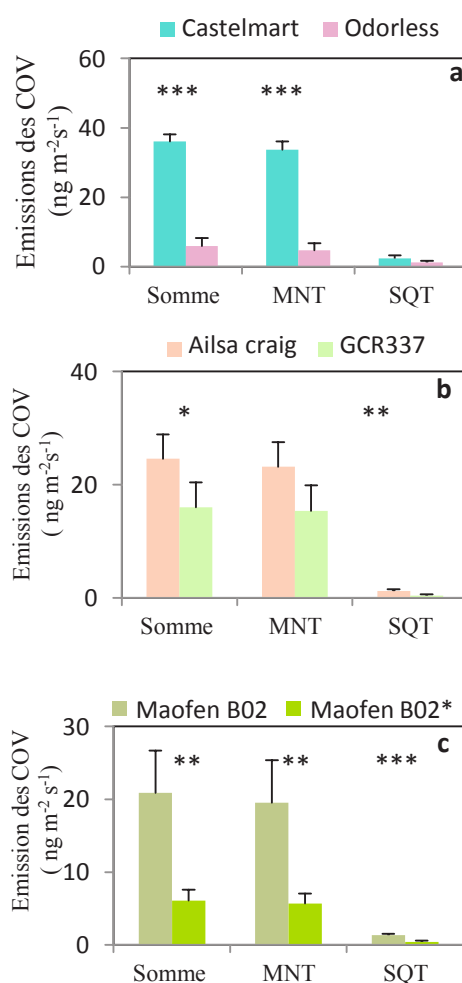


Figure 1. Somme des émissions des COV, monoterpènes MNT, et de sesquiterpènes SQT ng m⁻²s⁻¹ surface projetée de la plante chez les parents et leurs mutants, a : Castelmart et son mutant Odorless, b : Ailsa craig et son mutant GCR337, c : Maofen B02 et son mutant Maofen B02* (n= 3± SEM). Test de student. * : P ≤0.1, ** : P ≤0.05 ; *** : P ≤0.01.

L'analyse des émissions de COV a révélé de très faibles émissions par le mutant Odorless comparé à son parent sauvage. La somme des émissions de monoterpènes qui inclut 13 COV (voir tableau 1) était de 33.72±2.39 et 7.74±2.03 ng m⁻²s⁻¹ chez Castelmart et Odorless, respectivement (P=0.0003). La somme des émissions des sesquiterpènes qui comprend 4 COV était en moyenne de 2.36±0.97 et 1.27±0.46 ng m⁻²s⁻¹ (différence non significative P=0.25), tandis que la somme des émissions totales de COV était de 36.08±2.03 et 6.01±2.27 ng m⁻²s⁻¹ chez Castelmart et Odorless respectivement (P=0.0002). Chez Ailsa Craig et son mutant, les émissions de monoterpènes (qui inclut 14 COV, tableau 1) étaient en moyenne

CHAPITRE II

de 23.17 ± 4.36 et 15.37 ± 4.51 ng m⁻²s⁻¹ respectivement (P=0.12), tandis que la somme des émissions des sesquiterpènes (qui inclut 5 COV) était de 1.20 ± 0.32 et 0.42 ± 0.20 ng m⁻²s⁻¹ chez le parent et son mutant respectivement (P=0.02). Tandis que la mesure des émissions de COV du parent sauvage Maofen B02 et de son mutant poilu a montré que le parent sauvage émet des quantités des COV supérieures à celles de son mutant (tableau 1) malgré la densité importante de ses trichomes qui tapissent l'ensemble de son feuillage et tige. La somme des émissions des monoterpènes qui inclut 13 COV était en moyenne de 19.50 ± 5.86 et 5.69 ± 1.34 ng m⁻²s⁻¹ chez le parent Maofen B02 et son mutant respectivement (P=0.04), tandis que la somme des émissions des sesquiterpènes qui comprend 5 COV était en moyenne de 1.36 ± 0.16 et 0.40 ± 0.20 ng m⁻²s⁻¹ chez le parent et son mutant respectivement (P=0.009) (tableau 1, figure 1).

Tableau 1. Emissions de COV des parents et leurs mutants ng m⁻² s⁻¹ surface de la plante projetée (n= 3± SEM). P représente la significativité de la différence entre chaque parent et son mutant. Test de student (le test statistique n'a pas été appliqué en cas d'absence totale d'émission d'un composé). MNT : monoterpène, SQT : sesquiterpène.

Classes	COV	Castelmart	Odorless	P	Ailsa craig	GCR337	P	Maofen B02	Maofen B02*	P
Monoterpènes	α-pinène	1.65±0.19	0.08±0.06	0.001	1.05±0.16	0.54±0.57	0.25	0.73±0.11	0.311±0.13	0.03
	β-pinène	0.29±0.2	0		0.08±0.1	0.06±0.03	0.78	0.07±0.01	0	
	β-myrène	1.07±0.67	1.25±0.43	0.794	0.24±0.05	0.36±0.30	0.55	0.82±0.14	0.26±0.09	0.01
	δ-2-carène	11.36±1.05	0		6.85±2.09	2.83±2.55	0.13	4.86±2.70	1.18±0.68	0.15
	α-phellandrène	1.16±0.04	0		0.88±0.2	1.27±0.78	0.47	0.25±0.3	0.09±0.1	0.58
	α-terpinène	0.53±0.05	0.02±0.03	0.0003	0.32±0.09	0.14±0.09	0.09	0.33±0.07	0.13±0.05	0.04
	p-cymène	1.06±0.55	0.07±0.04	0.08	0.41±0.19	0.39±0.04	0.82	0.43±0.1	0.09±0.09	0.03
	β-phellandrène	13.60±2.04	1.22±0.43	0.001	8.98±3.08	6.66±3.49	0.49	9.87±1.84	2.60±1.05	0.01
	β-ocimène	0.32±0.21	0.18±0.14	0.499	0.05±0.03	0.15±0.15	0.37	0.28±0.03	0.07±0.04	0.009
	γ-terpinène	0.16±0.007	0		0.14±0.03	0.12±0.05	0.58			
	linalool	2.29±2.9	1.9±1.5	0.915	3.84±1.59	2.57±0.72	0.29	1.53±2.03	0.83±1.1	0.71
	terpinolène	0.18±0.11	0		0.17±0.05	0.15±0.03	0.8	0.18±0.02	0.05±0.05	0.07
	MNT inconnu 1	0.09±0.06	0		0.10±0.06	0.070±0.01	0.55	0.02±0.02	0	
	MNT inconnu 2				0.07±0.08	0.07±0.01	0.99	0.017±0.02	0.01±0.01	0.91
Sesquiterpènes	δ-elemène	0.30±0.2	0.02±0.02	0.183	0.36±0.11	0.18±0.18	0.24	0.16±0.06	0.12±0.08	0.63
	β-caryophyllène	1.59±0.75	1.26±0.43	0.637	0.47±0.23	0.15±0.04	0.09	0.72±0.26	0.25±0.10	0.09
	α-humulène	0.40±0.26	0		0.12±0.09	0.03±0.02	0.19	0.09±0.03	0	
	β-copaène	0.07±0.04	0		0.14±0.03	0.03±0.03	0.01	0.15±0.19	0.03±0.03	0.48
	SQT inconnu				0.11±0.1	0.02±0.02	0.3	0.23±0.12	0	
Monoterpènes		33.72±2.39	4.74±2.03	0.0003	23.17±4.36	15.37±4.51	0.12	19.50±5.86	5.69±1.34	0.04
Sesquiterpènes		2.36±0.97	1.27±0.46	0.25	1.20±0.32	0.42±0.20	0.02	1.36±0.16	0.40±0.20	0.009
Somme des COV		36.08±2.03	6.01±2.27	0.0002	24.56±4.32	16.02±4.40	0.09	20.86±5.82	6.1±1.46	0.03

Le mélange des émissions de COV d'Odorless est dépourvu des monoterpènes β-pinène, δ-2-carène, α-phellandrène, γ-terpinène, terpinolène, et des sesquiterpènes α-humulène et β-copaène. Les autres COV sont émis en quantités inférieures à celles des plantes de Castelmart. L'analyse des émissions des COV des plantes du parent Ailsa craig et de son mutant a montré

CHAPITRE II

que ce dernier contient des quantités de monoterpènes légèrement inférieures à celles du parent. Les quantités de sesquiterpènes notamment β -caryophyllène et β -copaène émis par le mutant étaient inférieures par rapport au parent sauvage. La comparaison entre Maofen B02 et son mutant a montré des émissions réduites pour de nombreux monoterpènes tels que α -pinène, β -myrcène, δ -2-carène et β -phellandrène et sesquiterpènes, notamment β -caryophyllène, α -humulène et β -copaène de mutant MaofenB02* (tableau 1).

1.2 Analyse des teneurs des COV à la surface des feuilles des parents sauvages et leurs mutants

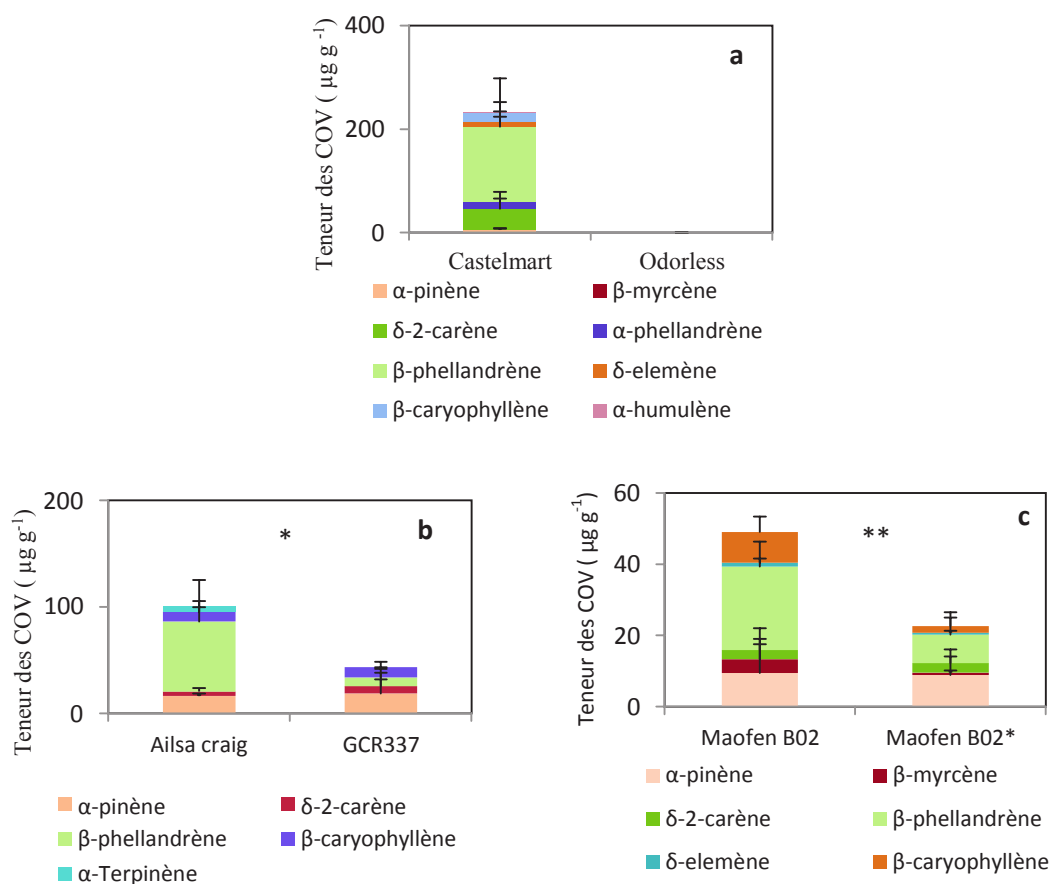


Figure 2. Teneur des COV chez les parents et leurs mutants $\mu\text{g g}^{-1}$ poids frais des feuilles chez a : Castelmart et son mutant Odorless, b : Ailsa craig et son mutant GCR337, c : Maofen B02 et son mutant Maofen B02* ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Test de student. *: $P \leq 0.1$, **: $P \leq 0.05$, ***: $P \leq 0.01$.

L'analyse des COV à la surface des feuilles a révélé la présence de 5 monoterpènes et 3 sesquiterpènes chez Castelmart (figure 2 (a), tableau 2) et une absence totale de ces composés

CHAPITRE II

chez Odorless. La somme de ces COV était 233.17 ± 143.70 et $0 \mu\text{g g}^{-1}$ chez Castelmart et Odorless respectivement. Chez Ailsa craig et GCR337, les teneurs des COV à la surface des feuilles était composé de α -pinène, δ -2-carène, α -terpinène, β -phellandrène, β -caryophyllène. Leur somme était de 100.44 ± 39.55 et $43.32 \pm 12.83 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivement ($P=0.08$) (figure 2 (b), tableau 2). Tandis que, chez Maofen B02 et son Maofen B02*, le mélange des COV à la surface des feuilles était composé de α -pinène, δ -2-carène, β -myrcène, β -phellandrène, β -caryophyllène et δ -elemène. Leur somme était de 48.99 ± 15.44 et $22.64 \pm 4.38 \mu\text{g g}^{-1}$ chez le parent et son mutant respectivement ($P=0.05$) (figure 2 (c), tableau 2).

Tableau 2. Teneur des COV des parents sauvages et leurs mutants $\mu\text{g g}^{-1}$ poids frais des feuilles ($n=3 \pm \text{SEM}$), P représente la différence de significativité entre chaque parent et son mutant, test de student, (le test statistique n'a pas été appliqué en cas d'absence totale d'émission d'un composé).

COV	Castelmart	Odorless	Ailsa craig	GCR337	P	Maofen B02	Maofen B02*	P
α -pinène	5.26 ± 3.38	0	16.09 ± 2.35	18.59 ± 23.23	0.87	9.47 ± 12	8.80 ± 7.20	0.95
β -myrcène	1.10 ± 1.10	0	0	0		3.82 ± 5.00	0.63 ± 0.63	0.43
δ -2-carène	39.65 ± 19.36	0	4.14 ± 3.44	6.93 ± 6.10	0.57	2.63 ± 1.58	2.66 ± 1.88	0.98
α -phellandrène	13.82 ± 18.70	0	0	0		0	0	
α -terpinène	0	0	4.99 ± 4.90	0		0	0	
β -phellandrène	145.03 ± 93.07	0	66.60 ± 38.91	8.04 ± 4.47	0.06	23.41 ± 6.95	7.99 ± 6.30	0.04
δ -elemène	9.59 ± 9.00	0	0	0		1.09 ± 1.00	0.53 ± 0.50	0.48
β -caryophyllène	17.83 ± 17	0	9.12 ± 4.39	9.75 ± 4.87	0.88	8.54 ± 4.38	1.91 ± 2.00	0.09
α -humulène	0.86 ± 1.0	0	0	0		0	0	
Monoterpènes	204.88 ± 126.06	0	91.28 ± 39.11	33.57 ± 17.55	0.09	39.35 ± 17.70	20.19 ± 7.21	0.2
Sesquiterpènes	18.69 ± 19.35	0	9.12 ± 4.39	9.75 ± 4.87	0.88	9.64 ± 4.18	2.45 ± 2.28	0.08
Somme des COV	233.17 ± 143.70	0	100.44 ± 39.55	43.32 ± 12.83	0.08	48.99 ± 15.44	22.64 ± 4.38	0.05

1.3. Analyses d'autres métabolites (sucres, vitamine C, polyphénols et flavonoïdes) chez Castelmart et Odorless

De manière exploratoire, d'autres métabolites (sucres, vitamine C, polyphénols et flavonoïdes) ont également été analysés chez Castelmart et Odorless, afin d'examiner si les variations des émissions de COV constitutives (spécialement mono et sesquiterpènes) étaient accompagnées par un changement d'autres métabolites (les méthodes de préparation et d'analyses sont décrites dans l'annexe 3-1).

CHAPITRE II

Tableau 3. Teneur en différents métabolites chez Castelmart et son mutant Odorless : les sucres et les acides organiques sont exprimés en (g/100 g MS), les vitamines en (mg/100g MS), les caroténoïdes, chlorophylle et composés phénoliques sont exprimés en mg/kg MS (n=6±SEM). P value représente la différence de significativité entre les deux génotypes, test t-student.

Classes	Composés	Castelmart	Odorless	P
Sucres	Glucose	1.37±0.15	0.62±0.16	<0.0001
	Fructose	1.97±0.16	1.34±0.26	0.006
	Saccharose	0.86±0.13	0.83±0.09	0.70
	Amidon	16.10±2.86	8.69±1.54	0.001
Acides Organiques	Ac. Citrique	1.43±0.27	1.96±0.25	0.01
	Ac. Malique	4.75±0.56	6.86±0.8	0.005
Vitamine C	Vit C totale	627.81±7.40	585.26±20.52	0.01
	Vit C réduite	509±13.27	427.12±18.21	0.0001
	réd/tot	0.81±0.01	0.73±0.01	0.0001
Caroténoïdes et Chlorophylles	Lutéine	727.56±44.32	739.65±5.15	0.60
	β-Carotène	678.66±45.83	665.01±10.19	0.57
	Chlorophylle-b	3026.85±198.47	3057±42.83	0.77
	Chlorophylle-a	9169.31±557.9	9101±153.24	0.82
Composés phénoliques	Ac. Neochlorogenic	53.63±12.73	43.33±13.77	0.29
	Ac. Chlorogenic	1385.16±150.19	1399.31±168.31	0.92
	Rutin	2454.52±544.51	957.27±117.82	0.001
	Kaempfer rutinoside	207.91±68.87	74.37±12.97	0.009
	C. Inconnu 1	1094.98±153.86	1241.68±176.78	0.31
	C. Inconnu 2	5573±675	5709±673.30	0.81
	C. Inconnu 3	703.73±75.38	895.19±123.59	0.06
	C. Inconnu 4	223.20±56.74	130.62±23.07	0.01

En général, Castelmart contient des quantités significativement plus élevées que son mutant Odorless pour les sucres (glucose, fructose et amidon), la vitamine C totale et réduite, la rutine et le kaempferol rutinoside. Tandis qu'Odorless stocke des teneurs d'acide citrique, et d'acide malique plus élevées que son parent Castelmart. Les teneurs en lutéine, chlorophylle a et b, β-carotène, l'acide chlorogenic et l'acide neochlorogenic n'étaient pas significativement différentes entre les deux génotypes (tableau 3). Les composés inconnus sont des composés phénoliques.

2. Caractérisation morphologique et histochimique des trichomes

Le premier objectif de cette étude est de décrire l'anatomie des différents trichomes présents sur les feuilles des trois mutants et de leurs parents. Afin de confirmer la présence ou l'absence des composés les plus abondants chez la tomate (stockage et émissions par les tissus), on s'est intéressé à deux grandes familles de composés à forte valeur écologique : les terpènes, et les aldéhydes en raison de leur réactivité chimique (Koncitlikova *et al.*, 2015).

CHAPITRE II

Nous avons réalisé une étude histochimique utilisant des colorations spécifiques des terpènes (coloration NaDI, David et Carde, 1964) et des aldéhydes (coloration de Schiff, Buffard-Taboga & Vilamaior 2001) pour enfin localiser les principaux composés stockés par la tomate dans les trichomes en utilisant la méthode de fluorescence avec déconvolution spectrale.

2.1. Analyse micromorphologique des trichomes par microscope électronique à balayage MEB

L'analyse de la morphologie des trichomes par MEB a été réalisée sur la plateforme de microscopie d'Avignon sur des feuilles adultes fraîches. L'échantillon a été monté sur un support en aluminium à l'aide d'une colle à base d'argent, et la métallisation à l'or a été réalisée par pulvérisation cathodique (sputter coater SCD004/ Balzers). Enfin les observations ont été réalisées à 10KV à différents grossissements à l'aide d'un MEB XL30, FEI –Philips.

2.2 Coloration histochimique

La caractérisation histochimique a été réalisée sur la plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale (Phiv) à Montpellier. En raison de la fragilité des trichomes, on a évité de réaliser des coupes des feuilles au vibratome. En effet, les premiers essais ont montré que l'incorporation des coupes des feuilles de tomate dans de la gélose entraînait une altération des trichomes très fragiles. Les coupes transversales des feuilles fraîches ont par la suite été effectuées à main levée. On a choisi pour les différentes analyses morphologiques et histochimiques des trichomes, des feuilles émergentes qui possédaient une importante densité de trichomes par rapport aux feuilles matures (Munien *et al.*, 2015). Et on a pris les surfaces abaxiales qui semblaient également contenir une densité de trichomes plus élevée que les surfaces adaxiales. Les coupes n'ont été ni traitées ni fixées par un fixateur.

2.2.1. Coloration des terpènes au NaDI (Naphthol Diméthyl-p-phényldiamine dihydrochloride)

Ce réactif forme par oxydation, du bleu d'indophénol dont la couleur change avec la variation du pH. En effet, il conserve sa couleur bleue en présence de terpènes et devient rouge vif en présence de résines. Il n'a pas été décrit à notre connaissance que ce réactif est spécifique d'une classe particulière de terpènes (volatils ou non volatils). Le réactif NaDI a été préparé avec 0,5 ml de solution de naphthol à 1 % dans de l'éthanol à 40 % et 0,5 ml de solution de chlorhydrate de 2 N, N diméthyl-phényldiamine à 1 % dans de l'H₂O ajouté à 49 ml de tampon phosphate, à 0,05 M et un pH de 7,2. Le tampon phosphate a été préparé à partir de

CHAPITRE II

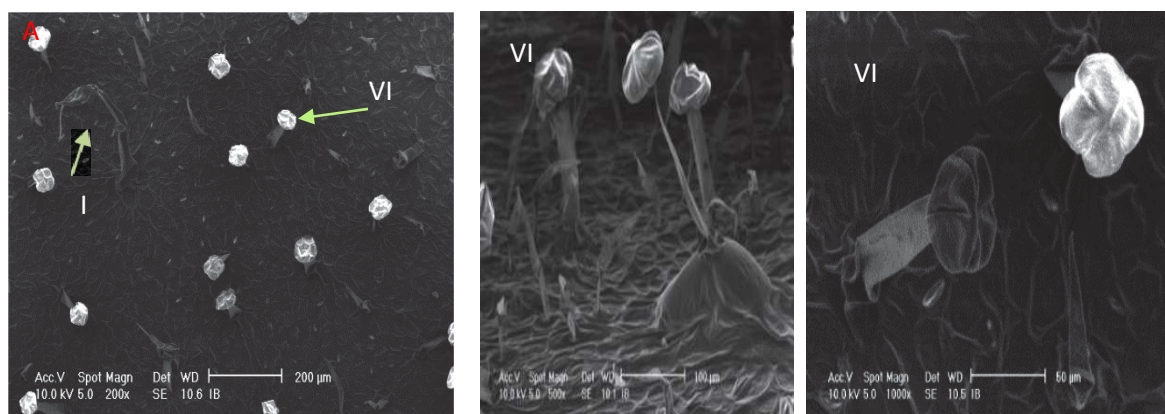
28 ml de solution de dihydrogénophosphate de sodium et 72 ml de solution dibasique de phosphate de sodium, 25 ml de cette solution de 100 ml ont été ajoutés dans 75 ml d'eau distillée. Les coupes transversales sont trempées dans ce réactif de NaDI pendant 1 heure. Elles ont été mises entre lame et lamelle avec une goutte de solution 50/50 de glycérol et de H₂O avant l'observation en lumière blanche sous le microscope. La présence des terpènes est indiquée par une réaction positive de ce réactif (une coloration bleue) (David et Carde, 1964).

2.2.2 Coloration des aldéhydes au réactif de SCHIFF (fuchsine basique)

La coloration au réactif de Schiff met en évidence la présence des aldéhydes dans les tissus végétaux. Les coupes réalisées ont été colorées par le réactif de Schiff à l'obscurité pendant 10 minutes, elles ont été ensuite rincées à l'eau distillée, et mises entre lame et la lamelle avec une goutte de solution 50/50 de glycérol et de H₂O. Le réactif de Schiff lorsqu'il est en présence de fonctions aldéhydes, forme un produit de condensation de coloration rose-rouge (Taboga & Vilamaior 2001). Après la coloration au NaDI et au réactif de Schiff, les coupes histologiques ont été observées à l'aide d'un microscope épifluorescence EPI Nikon (Nikon Eclipse NI_E) équipé avec une caméra Nikon DS-RI2, objectif 20X (plan APO 0.75 NA), à l'aide de la fonction EDF (Extended Definite Focus an anglais) du logiciel d'acquisition d'image.

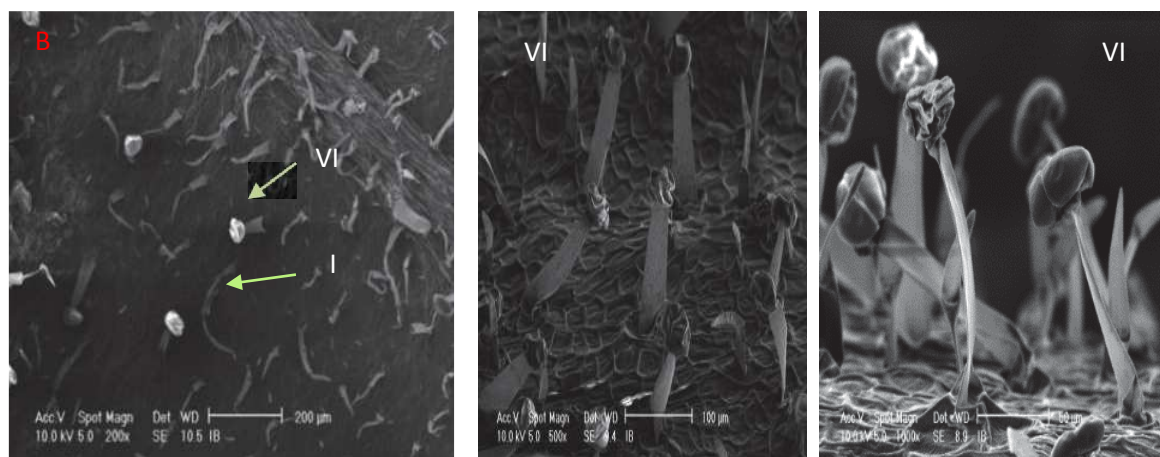
2.3. Résultats de Morphologie des trichomes

Castelmart

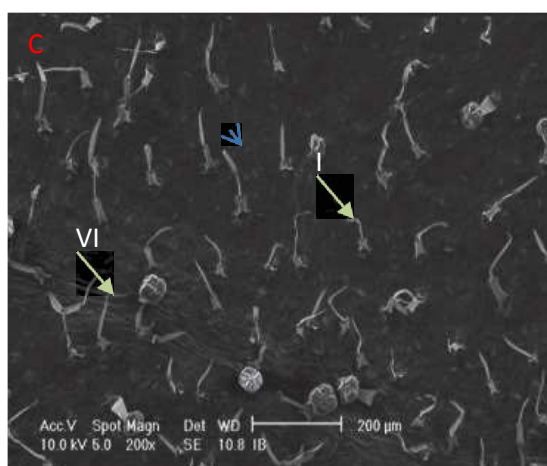


CHAPITRE II

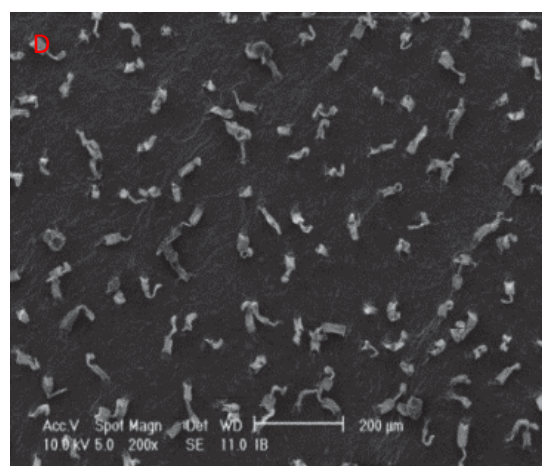
Odorless



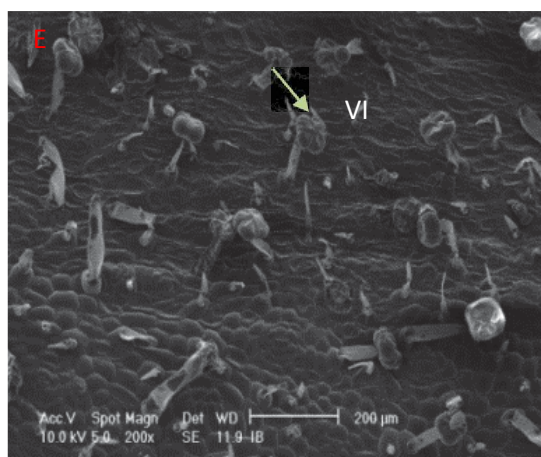
Ailsa craig



son mutant GCR 337



Maofen B02



son mutant Maofen B02*

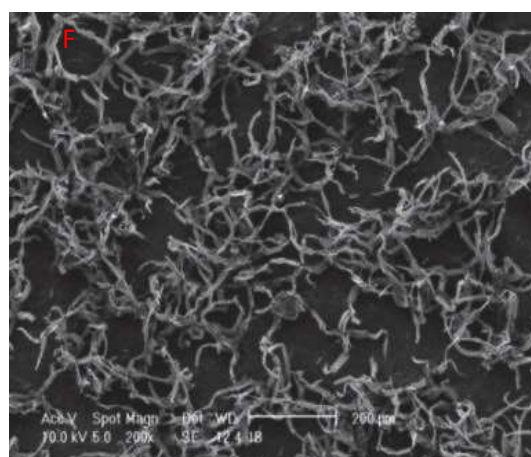


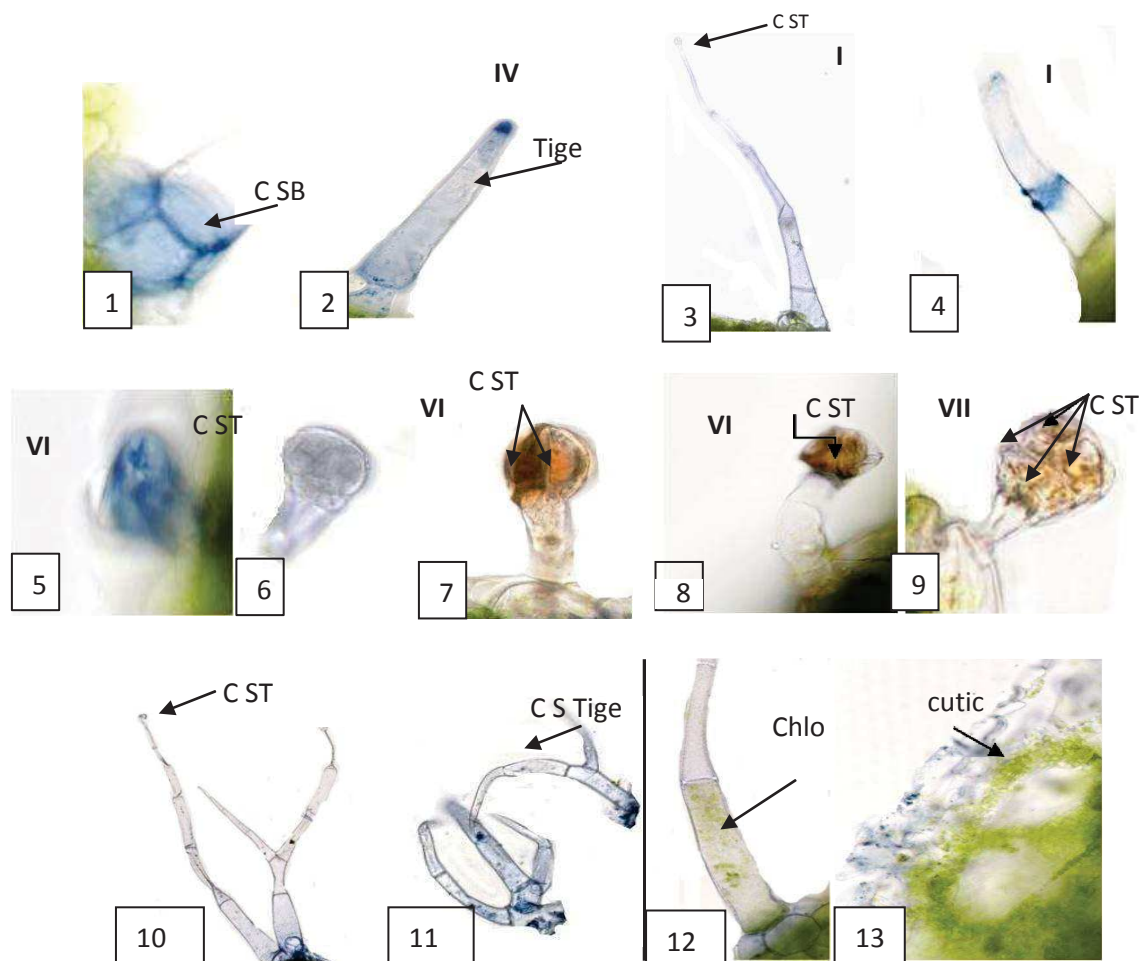
Figure 3. Images des trichomes foliaires (surface abaxiale) réalisées par MEB sur 3 génotypes sauvages de tomate et leurs 3 mutants.

CHAPITRE II

Morphologiquement, nos résultats montrent que les trichomes de chaque mutant sont différents de ceux du parent sauvage. La comparaison entre Castelmart et Odorless montre que ce sont principalement les trichomes de type I de Odorless (B) qui diffèrent de ceux de Castelmart, et plus spécifiquement la dernière cellule de tige du trichome de Odorless semble surélevée par rapport à celle de Castelmart (A). Les trichomes glandulaires de type VI semblent avoir une tige plus longue (B) (mais ceci n'est analysé que visuellement). Les trichomes capités et peltés du mutant hairless GCR337 (D) sont de taille réduite, tordues et déformés par rapport à son parent Ailsa craig (C). Tandis que le mutant poilu Maofen B02 ne présente pas des trichomes glandulaires de type VI et un nouveau type de trichome branché a été observé avec une grande densité (F). Cette dernière sera mesurée ultérieurement par comptage des trichomes de chaque type pour les deux premières paires de parents et mutants, mais elle ne sera pas possible chez le mutant Maofen B02. (Ces images ont été prises par Isabelle Bornard). (Voir annexe 2 pour plus de détail).

2.4. Résultats des analyses histochimiques

2.4.1. Coloration par le réactif de NaDI



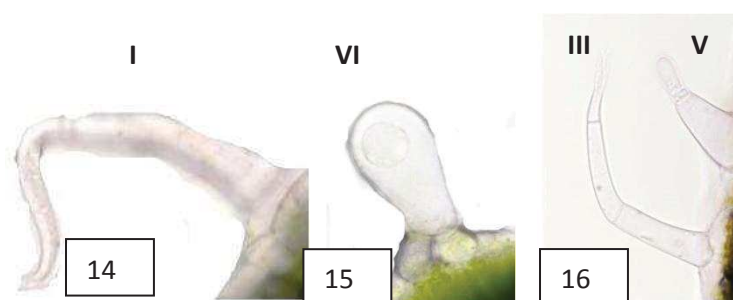


Figure 4. Trichomes après la coloration au NaDI.

code	trichome (ou partie de trichome)	réaction à la coloration de Nadi
1	base de trichome de type I	positive
2	trichome de type IV	positive
3	trichome de type I	positive
4	trichome de type I de hairless GCR337	positive
5 et 6	type VI des parents sauvages	positive
7 et 8	trichome de type VI de Odorless	négative
9	type VII de Odorless	négative
10 et 11	type I de trichome ramifié de mutant Maofen B02	positive
12	tige de trichome de type I de Odorless	positive
13	cuticule de GCR337	positive
14	trichome de type I de Odorless	négative
15	trichome type VI de GCR337	négative
16	trichomes non glandulaires de type III	négative

SB cellule basale, CST : cellule sécrétrice de tête, Chlo : chlorophylle, cutic : cuticule. Barre d'échelle : 20 μ m. Photos prises après la coloration des coupes avec réactif de NaDI. La coloration bleue indique la présence des terpènes. Observations réalisées par microscope EPI Nikon.

En général, les trichomes contiennent trois composantes (parties) : une base qui peut être uni ou multicellulaire, une tige avec une ou plusieurs cellules et une tête circulaire. La composition de cette tête en cellules sécrétoires diffère selon les types de trichomes : celle des trichomes peltés de type VI est composée de quatre larges cellules, cependant la tête des trichomes capités de types I et IV semble composée d'une seule cellule (figure 4 : 2 et 3).

Les résultats des analyses histochimiques ont montré une réaction négative des réactifs de NaDI dans les trichomes non glandulaires, c'est-à-dire, l'absence de composés terpéniques dans ces appendices (figure 4 :16). Une réaction positive du réactif de NaDI (coloration bleue) a été remarquée dans les trichomes glandulaires de types I, IV et VI. Chez le trichome de type I des 3 parents sauvages, les composés sont fortement sécrétés dans la base, le bas de la tige et la tête des trichomes (figure 4 :1,3). Chez le trichome de type IV, les composés sont sécrétés dans la tige et la tête (figure 2 :2). Cependant chez le trichome pelté, la coloration de NaDI a

CHAPITRE II

montré la présence des terpènes principalement dans la tête (figure 4 :5,6). Chez les mutants analysés, Le résultat le plus important révélé par la coloration de NaDi est l'absence des terpènes chez le trichome pelté de Odorless (ce trichome est la principale source de terpènes chez son parent Castelmart et chez presque toutes les plantes de la tomate (Tissier *et al.*,2017), cependant, le trichome a pris une coloration brin orangé (figure 4 : 7, 8, 9). En plus son trichome capité type I semble contenir la chlorophylle (figure 4 :12). Comparé au parent sauvage Ailsa craig, le mutant moins poilu hairless GCR337 a peu de terpènes dans ses trichomes de type I (figure 4 : 4), mais sa cuticule a pris une coloration bleue (13). Le mutant poilu Maofen B02 est dépourvu des trichomes glandulaires peltés, ses trichomes capités et trichomes ramifiés glandulaires et non glandulaires ont également été colorés en bleu (10,11).

2.4.2. Coloration par le réactif de Schiff

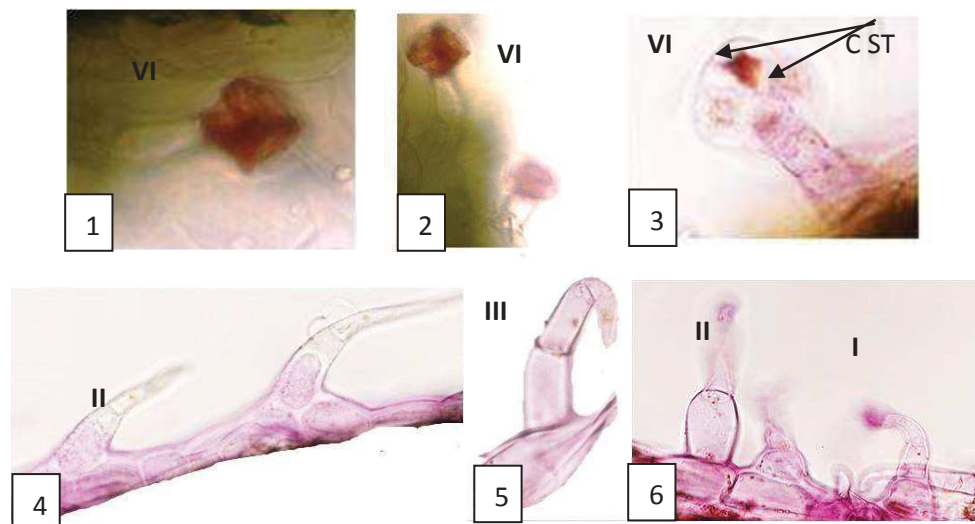


Figure 5. Trichomes après coloration au Schiff.

code	trichome
1 et 2	type VI de Odorless
3	type VI des parents sauvages
4 et 5	non glandulaires II et III
6	type I et II de GCR337

CST : cellule sécrétoire de tête. Barre d'échelle : 20 µm Photos prises après la coloration des coupes avec le réactif de Schiff, la coloration rose indique la présence des aldéhydes.

Cette coloration a révélé la présence d'aldéhydes dans les trichomes glandulaires capités et peltés de toutes les plantes analysées, mais aussi dans les trichomes non glandulaires (figure 5 :4,5). Chez Odorless, nous avons remarqué que la tige de VI est dépourvue d'aldéhydes, tandis que la coloration de sa tête semble être intense (figure 5 :1 et 2).

CHAPITRE II

Tableau 4.Présence et absence des trichomes glandulaires et non glandulaires chez les génotypes analysés (parents sauvages et leurs mutants respectifs) (n=5).

L'examen de présence/ absence des trichomes et des composés est basé sur des observations microscopiques (aucun traitement statistique n'a été réalisé).

Classes	génotypes	Trichomes glandulaire		Trichomes non glandulaire
		pelté	capités	
Terpènes (coloration de NaDi)	Castelmart	++**	+*	+
	Odorless	+	+*	+
	Ailsa craig	++**	+*	+
	GCR337	+*	+*	+
	Maofen B02	++**	+*	+
	Maofen B02*	-	++**	++
Aldehydes (coloration de Schiff)	Castelmart	++*	+*	+*
	Odorless	++**	++**	+*
	Ailsa craig	+*	+*	+*
	GCR337	+*	+*	+*
	Maofen B08	+*	+*	+*
	Maofen B08*	-	+*	++

++ : Présence forte des trichomes, + : Présence des trichomes, - : absence des trichomes, * présence de composés, ** forte présence de composés.

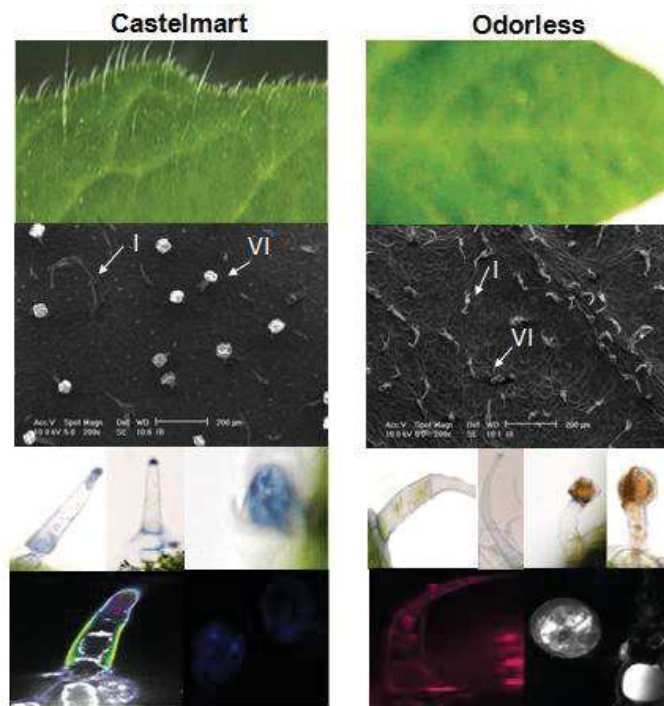
3. Comparaison entre les parents et leurs mutants/ Localisation des principaux COV dans les trichomes

Afin d'identifier et de localiser les principaux composés stockés dans les trichomes, on a choisi de les comparer à des extraits commerciaux purs car l'analyse des extraits naturels des feuilles de tomate, pourrait compliquer la décomposition des spectres des substances. Les substances standard choisies sont connues pour leurs abondance dans la composition de COV des feuilles de tomates : α -pinène, δ -2-carène, α -terpinène, linalool, β -caryophyllène et méthyl salicylate (Dehimeche *et al.*,2021, Kang *et al.*,2010,2012). (On ne possède pas β -phellandène en standard pur). Le principe de la méthode consiste à comparer les spectres fluoresçant des substances secrétés dans les trichomes, avec les spectres des standards commerciaux. Les spectres ont été combinés dans une base de données spectrale, et comparés à ceux des trichomes en utilisant la fonction Démélange linéaire (linear unmixing en anglais). (Chaque composé est représenté par une couleur et un spectre différent).

La partie ci dessous comprend une comparaison entre chaque parent et son mutant, les images de la morphologie des trichomes, un rappel de celles des analyses histochimiques et la localisation des COV par fluorescence des composés dans les trichomes.

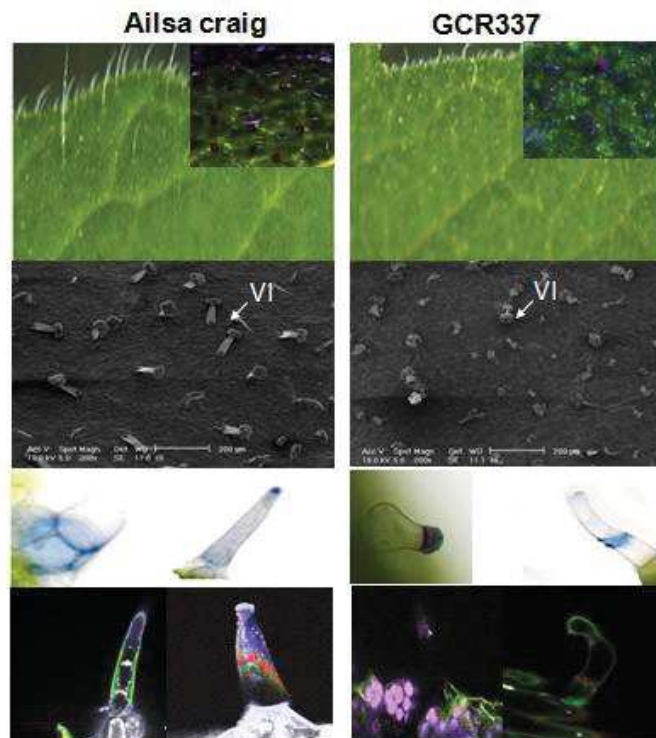
CHAPITRE II

1/ Castelmart et Odorless



■ δ -2-carène ■ α -pinène ■ linalool
 ■ α -terpinène ■ méthyl salicylate

2/ Ailsa craig et GCR337



■ δ -2-carène ■ α -pinène ■ linalool
 ■ α -terpinène ■ méthyl salicylate

CHAPITRE II

3/ Maofen B02 et son mutant Maofen B02*

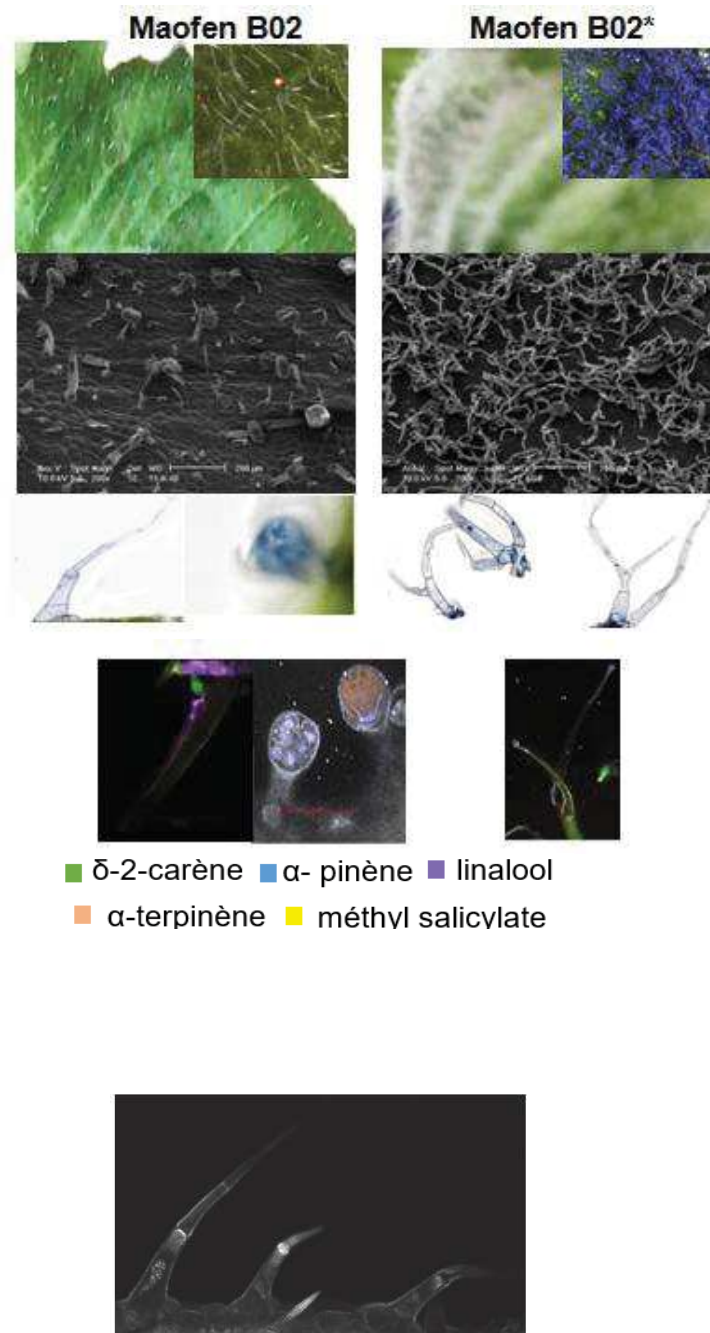


Figure 6. Comparaison entre les parents et leurs mutants, localisation des principaux composés stockés dans les trichomes par déconvolution spectrale. La couleur verte représente la fluorescence de δ -2-carène, orange : α -terpinène, jaune : méthyl salicylate, mauve : linalol, bleu représente α -pinène. Observations réalisées avec un microscope multiphoton Zeiss 880 par objectif 20x 1.0 NA.imm à la plateforme d'imagerie PHIV, et traitées par le logiciel ZEN black édition V2.0. Barre d'échelle : 50 µm.

CHAPITRE II

Les composés sécrétés sont parfois distribués sur des parties définies dans le trichome (base, tête ou tige ou des parties spécifiques des tiges, haut, bas. ect), parfois plusieurs composés sont superposés sur la même partie. Une différence de localisation des COV était remarquée principalement entre les deux types des trichomes glandulaires les plus abondants VI et I, chez le trichome capité, les COV se localisent sur la cuticule de trichome. Une spécificité pour α - pinène quelque soit le type de trichome (capité ou pelté), ce COV est toujours stocké à l'intérieur des cellules sécrétoires et pas sur la cuticule de trichome. Tandis que le δ -2-Carene se localise sur la cuticule de la tige et β - Caryophyllène sur la base, alors que linalool et méthyl salicylate sont peu abondants et localisés dans le haut de trichome.

Chez le trichome ramifié de mutant Maofen B02, la présence de composés est sur les deux tiges de trichome, avec une présence de linalool sur les têtes de trichomes. Chez le trichome de type VI (de tous les parents sauvages), une forte présence de α -pinène est observée dans les 4 cellules sécrétoires, la présence des substances est concentrée sur les cellules sécrétoires, et très peu sur la cuticule du trichome. Comme remarqué sur la coloration de terpène par le réactif de NaDi, chez Odorless, le trichome type VI ne présente aucune fluorescence, ce qui confirme, les résultats des tests histochimiques de coloration. D'autre part, nous avons constaté que le matériel sécrété se distribuait différemment dans des vésicules de forme irrégulière situées à l'intérieur des cellules. En outre, les cellules sécrétoires semblent contenir d'autres métabolites (fluorescents) dont certains pourraient être la chlorophylle indiquée par une couleur rose chez Odorless. En outre, chez les trichomes non glandulaires, aucune sécrétion des COV n'a été remarquée (absence totale des composés) comme a montré l'analyse histochimique des terpènes (figure 6).

CHAPITRE II

4. Discussion

La présente étude visait à fournir des informations sur les émissions des COV constitutifs et sur les teneurs des COV à la surface des feuilles des parents et des mutants, et sur la morphologie des trichomes et la distribution des COV dans les trichomes. Pour cela j'ai identifié et quantifié les émissions et les teneurs des COV, j'ai analysé la micromorphologie des trichomes et j'ai examiné la présence des terpènes et aldéhydes dans les trichomes par des colorations histochimiques, et finalement j'ai localisé les principaux composés stockés dans les trichomes.

1. Identification et quantification des émissions et teneurs de COV

L'analyse des émissions de COV des parents et mutants a révélé des différences qualitatives et quantitatives. Tous les mutants ont émis des quantités de COV inférieures à leurs parents, principalement chez Odorless et Castelmart. Les émissions sont composées de mono et sesquiterpènes, et le taux d'émissions varie de 6 à 36 ng m⁻²s⁻¹. Des différences qualitatives et quantitatives ont également été observées dans les teneurs des COV à la surface des feuilles. Teneurs et émissions ont suivi les mêmes tendances, suggérant que le stockage (trichomes) est la source majeure des émissions de COV chez la tomate.

2. Analyses morphologiques des trichomes

Nos observations microscopiques et histochimiques ont révélé la présence de huit types de trichomes : des trichomes glandulaires et non glandulaires (types I, IV, VI, VII et II, III, V) et des trichomes ramifiés. La présence de ces trichomes a été signalée précédemment chez les Solanacées (Harisha et Switu 2013, Adedeji et al.2007), et chez la tomate en particulier (Tissier, 2012, Tissier *et al.*, 2017). Les deux types les plus abondants étaient les trichomes glandulaires de type I et VI (Tissier *et al.*,2017, Kang *et al.*,2012,2010). Les trichomes de chaque mutant étaient différents du parent sauvage morphologiquement. Ces différences se résument à une taille réduite et une déformation des trichomes capités et peltés chez le mutant Peu poilu GCR337 qui ne semble ne pas avoir de trichomes sur l'ensemble de son feuillage. Les trichomes capités de type I du mutant Odorless, l'absence des trichomes peltés chez le mutant poilu Maofen B02 et la présence des trichomes glandulaires et non glandulaires branchés sont les principales différences. Chez ce mutant, les trichomes étaient extrêmement nombreux, très longs et presque jamais droits, mais pliés et superposés les uns sur les autres.

Kang *et al.* (2016) ont analysé les trichomes d'un mutant peu poilu de Ailsa Craig très

CHAPITRE II

semblable à notre mutant GCR337 et a révélé la présence de trichomes glandulaires de tailles réduites et déformés par rapport à *Ailsa craig*. L'analyse de la morphologie des trichomes de *Odorless* a montré que ses trichomes de type I sont surélevés et de forme irrégulière par rapport au parent sauvage *Castelmart*. L'étude de Kang *et al.* (2012) a confirmé ceci. Les trichomes ramifiés observés chez le mutant poilu Maofen B02* ont été observés chez *sects Polium*, (Lamiacées) (Navarro *et al.*, 1999), et *Withania somnifera* Dunal (Solanaceae) (Munien *et al.*, 2015), mais ils ne sont pas trop abondants chez les plantes en général.

Les colorations histochimiques des coupes réalisées par le réactif de NaDi ont indiqué la présence de terpènes dans les trichomes glandulaires capités et peltés. Les terpènes sont typiquement trouvés dans la sécrétion des trichomes glandulaires de diverses espèces de plantes (Turner *et al.*, 2000, Machado *et al.*, 2006), et chez la tomate (Kang *et al.*, 2012, Schillmillert *et al.*, 2010). La plus importante observation révélée par la coloration de Nadi est l'absence de terpènes dans les trichomes glandulaires peltés de type VI chez le mutant *Odorless*. Cela confirme nos résultats d'analyse des teneurs de COV à la surface des feuilles. Cependant le trichome a pris une coloration brun orangé. Il n'a pas été démontré qu'en cas de réaction négative au NaDi, la couleur brun orangé indique la présence d'une autre classe de composés. Cependant, dans une analyse de Munien *et al.* (2015) des trichomes glandulaires de *Withania somnifera* (Solanaceae), colorées en brun orangé ont indiqué une réaction positive de Wagner's and Dittmar (Furr et Mahlberg, 1981, Ascensao et Pais, 1987) ce qui indique la présence d'alcaloïdes. Cette coloration pourrait indiquer la présence de ces composés ou d'autres métabolites chez le mutant *Odorless*. Le mutant moins poilu GCR337 a peu de terpènes dans ses trichomes de type I et VI, mais la présence de terpènes sur sa cuticule a été remarquée. On suppose que chez ces derniers la cuticule est un lieu de stockage en raison de la taille réduite et de la morphologie déformée des trichomes. En outre, nos observations microscopiques ont révélé que le matériel sécrétoire a été parfois libéré, ce qui pourrait être dû au stress mécanique lors de l'installation des coupes sur la lame ou l'écrasement avec la lamelle. Contrairement aux terpènes, dont la présence n'était observée

CHAPITRE II

que dans les trichomes glandulaires, les aldéhydes étaient présents dans les deux types de trichomes.

3. Localisation des composés dans les trichomes

Les colorations histochimiques des terpènes et des aldéhydes ont permis de localiser de manière générale les classes des substances dans les trichomes glandulaires (base, tige ou tête), cependant elles restent très peu spécifiques puisqu'elles ne permettent pas d'identifier et de localiser les composés individuels secrétés. Plusieurs auteurs supposent que les substances secrétées sont synthétisées sur place dans les trichomes (Tissier *et al.*, 2017), cependant on ne sait pas ou peu comment les composés se distribuent dans le trichome. La localisation des composés fluorescents dans les trichomes par la méthode de déconvolution spectrale a permis de visualiser les substances au sein des trichomes. Nos analyses confirment que le trichome pelté de type VI de la tomate stocke des composés dans la cavité intercellulaire entre et dans les cellules sécrétoires (Tissier *et al.*, 2017). Ce trichome se compose d'une cellule basale, d'une tige courte, et d'une tête composée de nombreuses cellules sécrétoires (voir introduction pour description des trichomes). Comparant les deux types de trichomes glandulaires, les cellules des trichomes peltés de type VI, sont liées entre elles en formant une masse cellulaire. On a remarqué que l'enveloppe extérieure des parois des trichomes de type VI ne fluoresce que très peu, contrairement aux cellules des trichomes capités, où elles sont réparties tout au long de la tige et à la base, de manière distincte (aléatoire). Il a été décrit que chez le trichome de type I, les composés sont secrétés à l'extrémité du trichome (Tissier, 2012). Cependant, nos observations microscopiques ont indiqué que les composés sont secrétés également tout au long de la tige et sur la paroi. Comparés aux trichomes peltés, les trichomes capités paraissent posséder un mélange terpénique beaucoup plus complexe de substances sécrétoires. D'autres composés qui ne sont pas analysés semblent être présents dans les trichomes capités principalement chez *Odorless*. L'hypothèse selon laquelle les trichomes peltés sécrètent des composés volatils et les trichomes capités sécrètent principalement les composés peu et non volatils (Kim *et al.*, 2012) n'a pas pu être confirmée par nos observations microscopiques. En effet, les composés volatils étaient répartis dans les deux types de trichomes de manière différente. Mais on suggère que d'autres substances pourraient être présentes dans les trichomes capités. Nous avons remarqué que les tiges des trichomes glandulaires sont parfois composées d'une ou deux rangées de cellules. Ces cellules pourraient réagir comme cellules barrières face aux stress environnementaux. Il a été suggéré

CHAPITRE II

que ces cellules mêmes constituent des parois latérales qui empêchent la diffusion des métabolites dans l'apoplaste (Werker, 2000).

L'examen de la localisation des exsudats dans les trichomes pourrait par la suite aider à comprendre leur mécanisme d'émissions, puisque le transport et la diffusion des composés secrétés sont liés à la distance parcourue par le composé depuis son lieu de stockage vers l'atmosphère (Tissier *et al.*, 2017). On suppose que les COV secrétés à l'extérieur des cavités de stockage ou sur les parois des trichomes nécessitent moins de transport actif pour être diffusé. Par la suite, ils pourraient réagir rapidement comme barrière chimique face aux stress environnementaux, comme l'O₃. La localisation des métabolites secrétés est très peu abordée, et notre étude fournit des informations sur le positionnement des COV secrétés dans chaque type de trichome. La relation entre les types de trichomes, leurs compositions et la localisation des COV secrétés pourrait aider les généticiens et les sélectionneurs végétaux à identifier des traits spécifiques afin de renforcer la production des trichomes et des COV ayant un intérêt agro écologique.

CHAPITRE III

Rôle des trichomes et des COV dans la réponse des plantes à l'ozone

CHAPITRE III

Cette étude a pour objectif principal de détecter des traits morphologiques (trichomes) et/ou physiologiques (COV) impliqués dans la tolérance des plantes à l'O₃ et susceptibles d'être retenus pour l'amélioration de leur résistance au stress oxydatif. Les expérimentations ont été menées en conditions environnementales contrôlées sur les deux parents MAGIC sélectionnés dans la première étude Cervil et LA0147 (chapitre 1), et les parents et les mutants dont les émissions et teneurs en COV ainsi que la morphologie des trichomes ont été caractérisées dans le chapitre 2. Additionnellement aux mesures de dépôt d'O₃ total sur les plantes et de mesure de dépôt chimique d'O₃, les effets du stress oxydatif causé par l'O₃ ont été analysés par les mesures écophysiologicals (photosynthèse, conductance stomatique, teneurs en chlorophylle, rendement quantique maximal adapté à l'obscurité du photosystème II (PSII) : Fv/Fm). En parallèles les dommages visibles sur les feuilles ont été quantifiés, et les émissions de COV induites lors de l'exposition des plantes à l'O₃ ainsi que les teneurs en COV après l'exposition des plantes à l'O₃ ont été mesurées.

Les plantes de tomates ont été semées à plusieurs reprises au cours de la période expérimentale, dans le but d'avoir en permanence des plantes à un stade de croissance similaire. Les conditions de culture sont comparables à celles des première et deuxième études (voir chapitre 1).

1. Matériels et méthodes

1.1. Déroulement de l'expérimentation, système de mesure du dépôt d'O₃ plante total et du dépôt d'O₃ chimique

Le dispositif expérimental est constitué principalement de deux cloches cylindriques en verre (figure 2, 3) d'un volume de 5.3 L. La plante dont les teneurs en chlorophylle et Fv/Fm étaient préalablement mesurées, était installée dans une cloche 15 h avant le début du traitement de fumigation des plantes, afin d'éviter l'explosion des COV par les trichomes, due au stress mécanique pendant l'installation. Le jour de l'expérimentation, une période de 1 h d'acclimatation aux conditions a précédé les traitements de fumigation. Ces derniers ont été réalisés sous conditions environnementales contrôlées ainsi que les mesures d'échanges gazeux et l'échantillonnage des COV (figure 1). Afin de mesurer le dépôt d'O₃ chimique correspondant à la réaction en phase gazeuse des COV avec l'O₃, l'air avec les COV issus de cette cloche contenant la plante a été transféré dans une deuxième cloche vide, connectée à la première par aspiration à l'aide d'une pompe (figure 2). Les traitements d'exposition des plantes à l'O₃ ont été effectués en appliquant des concentrations d'O₃ [O₃] croissantes. L'O₃ a

CHAPITRE III

été produit par un ozoniseur et analyseur/détecteur d'O₃ photométrique UV, Model-49i (thermo Fisher Scientific, Franklin MA, Etats- unis). Un flux d'air enrichi en O₃ à des concentrations contrôlées (1.7 l/min) a été mélangé avec l'air ambiant filtré entrant dans la chambre (7.3 l/min) (pour un débit total de 8.8 l/min). Les [O₃] avec lesquelles on a fumigé nos plantes étaient comme suit: 100 ± 10 nmol mol⁻¹ d'O₃ pendant 1h, suivie de 200 ± 10 nmol mol⁻¹ pendant 1h, et ainsi de suite progressivement, augmentant la concentration d'O₃ de 100 nmol mol⁻¹ par heure jusqu'à 600 nmol mol⁻¹. (Cette concentration finale d'O₃ a été choisie afin de provoquer des dégâts et des réactions quantifiables). Entre chaque concentration d'O₃ appliquée sur la plante dans sa chambre, parallèlement la chambre vide a été fumigée avec des mêmes concentrations d'O₃ (jusqu'à 400 ppb) (figure 1) avec un débit d'air de 5.8 l/min. On estime que le temps de résidence des COV dans la chambre avec plante est de l'ordre de 1 à 2 min. Les concentrations d'O₃ ont été mesurées à l'entrée et à la sortie de la cloche par deux générateurs /analyseurs d'O₃ aux mêmes moments avec un débit de mesure de 1.3-1.4 l/min, et ont été enregistrées toutes les 5 min. Les teneurs [CO₂] et la température étaient les mêmes que celles utilisées dans l'étude de criblage des émissions des COV (chapitre 1 et 2) : 400 ppm et 30 °C, respectivement. Cependant l'intensité lumineuse a été fixés à 400 ± 30 µmol m⁻² s⁻¹ (PPFD) (dans le but d'éviter les intensités lumineuses élevées et un stress oxydatif supplémentaire). Les systèmes de mesure de la température et de la lumière, et des échanges gazeux sont également les mêmes que ceux décrits dans le chapitre 1.

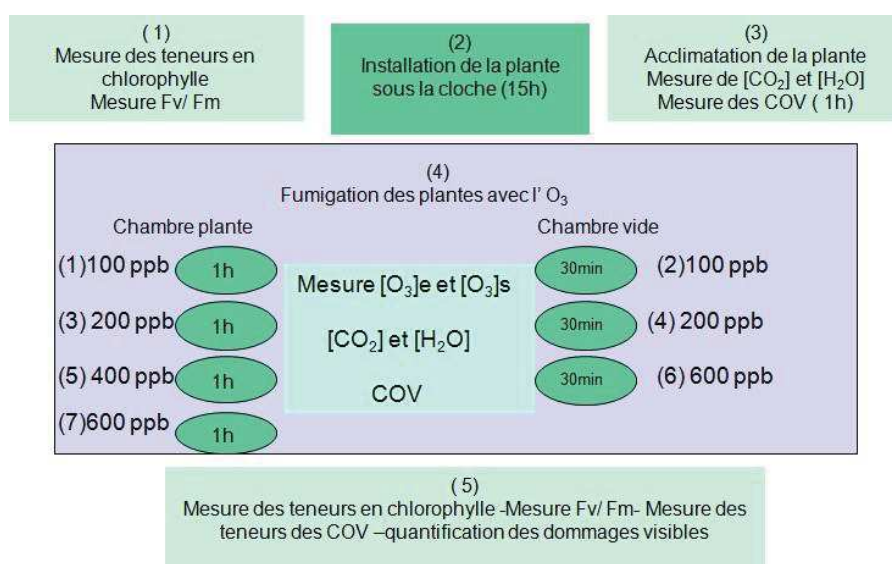
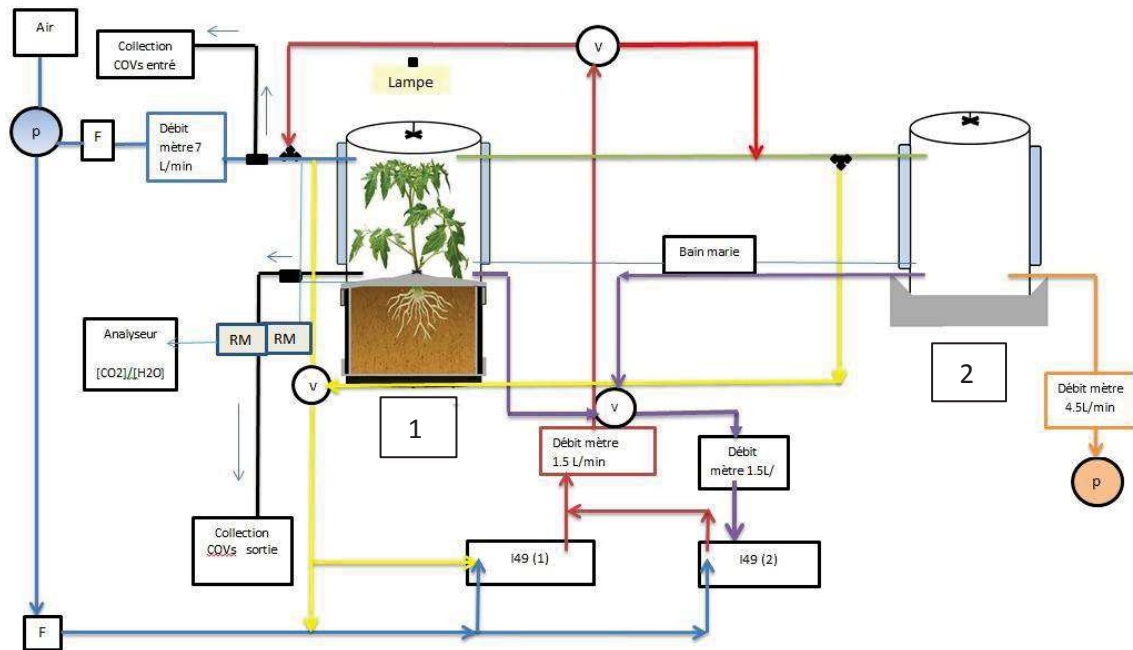


Figure 1. Déroulement de l'expérimentation résumé en 5 étapes principales incluant les différentes mesures et traitements d'O₃.

CHAPITRE III



1 : chambre plante (pour mesure de dépôt d'O₃ total)

2 : chambre de réaction des COV émis par la plante avec l'ozone (mesure du dépôt

chimique) → Air ambiant filtré

— Air de la cloche 1 transféré à la cloche 2

→ Air enrichi avec l'ozone dans la chambre 1

→ Air enrichi avec l'ozone dans la chambre 2

→ Mesure de [O₃] à l'entrée des deux cloches

→ Mesure de [O₃] à la sortie des deux cloches

→ Air aspiré de la cloche 2

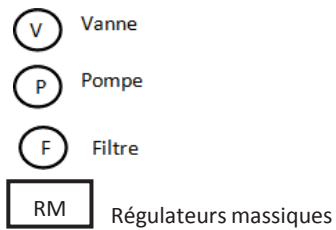


Figure 2. Dispositif expérimental de fumigation des plantes avec l'ozone.

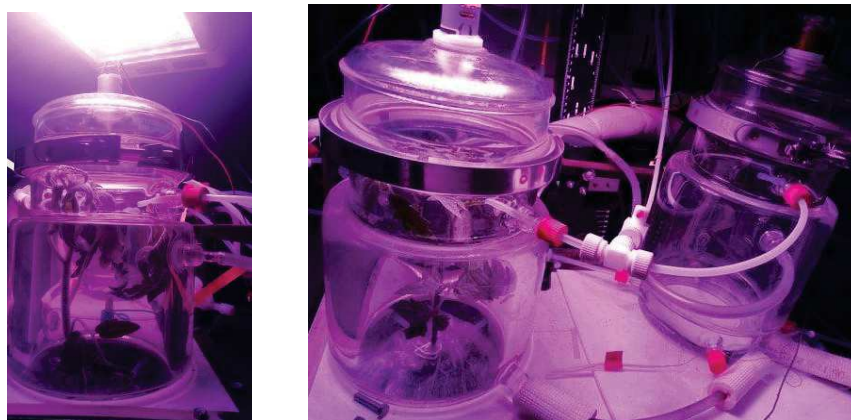


Figure 3. Chambre plante (à gauche), chambre de réaction des COV avec l'O₃ connectée à la chambre plante (à droite) pour mesurer le dépôt d'O₃ chimique.

CHAPITRE III

Remarques

Pour la comparaison de la réponse des plantes et les dépôts d'O₃ entre LA0147 et Cervil, on a fixé [O₃] à l'intérieur de la cloche pour que les plantes soient exposées aux mêmes concentrations de l'O₃. Cependant, on a constaté qu'au cours de l'exposition des plantes les [O₃] dans la cloche changeaient et un ajustement a été réalisé. Pour cela, on a fixé [O₃] à l'entrée des cloches pour la comparaison des réponses des plantes et les dépôts d'O₃ entre les autres génotypes (parents et mutants). De manière générale, les concentrations d'O₃ avec lesquelles on a fumigé nos plantes pourraient être comparées aux concentrations d'O₃ atmosphériques réelles: suite à la fumigation des plantes avec 100 ppb d'O₃, les plantes étaient exposées à environ 30 ppb, ce qui est équivalent(à peu près) à la moyenne annuelle de [O₃] en France. A 200 ppb, les plantes étaient exposées à une moyenne de 60 à 70 ppb, tandis qu'à 400 ppb, elles étaient exposées à environ 180 à 170 ppb, et à la concentration la plus élevée (600 ppb), les plantes étaient exposées à environ 200 à 300 ppb d'O₃. Ces dernières concentrations pourraient exister réellement dans les villes avec une pollution atmosphérique élevée comme en chine.

1.2. Calcul de la photosynthèse, transpiration et conductance stomatique

Le taux de la photosynthèse (A), la transpiration (E) et la conductance stomatique (g_s) ont été calculées selon von Caemmerer et Farquhar (1981) comme suit :

$$A = \frac{F}{s} \cdot [CO_{2e} - \left(\frac{1-H_{2Oe} \times 10^{-3}}{1-H_{2Os} \times 10^{-3}} \right) \cdot CO_{2s}] \quad \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (1)$$

$$E = \frac{F}{s} \cdot \frac{H_{2Os} - H_{2Oe}}{1 - H_{2Os} \times 10^{-3}} \quad \text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (2)$$

$$g_s = \frac{103 \cdot E \left(1 - \frac{H_{2O s} + H_{2O i}}{2 \times 10^3} \right)}{H_{2O i} - H_{2O s}} \quad \text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (3)$$

Avec F, le débit d'air dans la chambre (l/min), s est la surface de la plante (m²), H_{2O_e} et CO_{2e} sont la pression de vapeur d'eau et de CO₂ respectivement à l'entrée dans la cloche, H_{2O_s} et CO_{2s} sont la pression de vapeur d'eau et de CO₂ à la sortie de la cloche. H_{2O_i} est la fraction molaire de vapeur d'eau à l'intérieur de la feuille en (mmol mol⁻¹), elle est généralement supposée être la fraction molaire de saturation à la température de la feuille (Ball, 1987).

CHAPITRE III

1.3. Calculs des dépôts d'O₃

Le dépôt d'O₃ total et dépôt d'O₃ plante ont été calculés selon Li *et al.* (2018).

Dépôt d'O₃ total

$$\Phi_{O_3 T} = \frac{F}{s} (CO_{3e} - CO_{3s}) \quad \text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \quad (4)$$

F est le débit d'air dans la chambre plante (l/min), s est la surface projetée des feuilles et de la tige de la plante analysée (m²). CO_{3e} et CO_{3s} sont les concentrations d'O₃ dans l'air entrant et sortant de la chambre (nmol mol⁻¹) respectivement.

Correction de dépôt d'O₃ dans les chambres vides

Les pertes d'O₃ dans les chambres et le système de mesure ($\Delta O_{3 \text{ chambre}}$) ont été analysées par soustraction des [O₃] entrant et sortant de la cloche vide (sans plante) aux mêmes [O₃] que celles utilisées pour la fumigation des plantes et dans les mêmes conditions environnementales. Cette perte est due au dépôt et à la réaction de l'O₃ avec les surfaces des matériaux de la cloche et des tuyaux utilisés pour alimenter les cloches avec l'air ou pour mesurer l'O₃ dans le système. Cette perte est mesurée toute au long de la période d'expérimentation dans les deux chambres de mesure et calculée comme suit :

$$\Delta O_{3 \text{ chambre}} = (CO_{3e} - CO_{3s}) \quad \text{nmol mol}^{-1} \quad (5)$$

Avec CO_{3e} est [O₃] à l'entrée de la chambre et CO_{3s} à la sortie de la chambre. Cette perte a été soustraite du dépôt d'O₃ total pour corriger le dépôt d'O₃ plante, et le dépôt chimique, respectivement. Elle représentait de 15% à 24% du dépôt total mesuré avec la plante, et 15 % du dépôt chimique dans la chambre vide.

Dépôt d'O₃ par plante:

$$\Phi_{O_3 P} = \frac{F}{s} (CO_{3e} - CO_{3s} - \Delta O_{3 \text{ chambre}}) \quad \text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \quad (6)$$

F est le débit d'air dans la chambre plante (l/min) , s est la surface projetée des feuilles et de la tige de la plante analysée (m²). CO_{3e} et CO_{3s} sont les concentrations d'O₃ dans l'air entrant et sortant de la chambre (nmol mol⁻¹) respectivement. $\Delta CO_{3 \text{ chambre}}$ est la perte d' O₃ dans la chambre plante.

CHAPITRE III

Dépôt d'O₃ chimique aérien :

$$\Phi O_{3\text{chimique}} = \frac{F}{S} (CO_{3e} - CO_{3s} - \Delta O_{3\text{ chambre}}) \quad \text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (7)$$

F est le débit d'air dans la chambre de réaction, s est la surface projetée des feuilles et de la tige de la plante analysée (m²). CO_{3e} et CO_{3s} sont les concentrations d'O₃ dans l'air entrant et sortant de la chambre de réaction des COV avec l'O₃ (nmol mol⁻¹) respectivement.

Dépôt d'O₃ surfacique total :

$$\Phi O_{3S_{\text{tot}}} = \Phi O_{3P} - \Phi O_{3\text{chimique}} \quad \text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (8)$$

Le dépôt d'O₃ surfacique total a été calculé comme le dépôt d'O₃ plante – dépôt d'O₃ chimique.

Dépôt d'O₃ stomatique:

$$\Phi O_{3gs} = (CO_{3s} - C^i O_3) \frac{gs}{2.03} \quad \text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (9)$$

Avec Cⁱ O₃ est la concentration intercellulaire d'O₃ (nmol mol⁻¹), gs est la conductance stomatique (la moyenne calculée sur la période de mesure) et 2.03 est le rapport de la vapeur d'eau aux diffusivités de O₃ (Li *et al.*, 2017). Cⁱ est égal à zéro (voir remarques ci-dessous).

Dépôt d'O₃ cuticulaire:

$$\Phi O_{3\text{cutic}} = \Phi O_{3P} - (\Phi O_{3gs} + \Phi O_{3\text{chimique}}) \quad \text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (10)$$

Remarques

Le taux moyen de dépôt d'O₃ stomatique a été estimé à partir de la concentration moyenne en O₃ de la chambre et de la conductance stomatique moyenne pendant toute la période de fumigation en supposant que l'absorption d'O₃ à travers la couche cuticulaire était négligeable (Kerstiens et Lenzian, 1989) et que la concentration intercellulaire en O₃ était nulle (CⁱO₃ = 0), puisqu'il réagit rapidement à l'intérieur des espaces intercellulaires (Laisk *et al.*, 1989). Or, Moldau et Bichele (2002) ont montré que les concentrations d'O₃ à l'intérieur des feuilles sont légèrement supérieures à zéro (CⁱO₃ > 0), surtout à des concentrations élevées. L'O₃ peut s'accumuler dans les espaces intercellulaires et atteindre également le mésophylle des feuilles (Loreto et Fares, 2007). On considère aussi dans le calcul de ΦO_{3gs} que la concentration d'O₃ dans la couche limite de la feuille au-dessus des stomates (CO_{3bl}) est la même que dans la

CHAPITRE III

chambre ($CO_{3bl} = CO_{3s}$) en supposant que la résistance de la couche limite est négligeable en raison de l'homogénéisation de l'air par le ventilateur installé dans les chambres, et parce que les réactions surfaciques à proximité n'ont pas d'influence sur CO_{3bl} . Cette hypothèse est également questionnable, notamment chez les plantes dont les feuilles sont couvertes de trichomes comme chez la tomate. La présence des trichomes glandulaires et non-glandulaires peut augmenter à la fois la résistance de la couche limite et les réactions surfaciques (cuticulaire ou avec des exsudats non-volatils des trichomes) entraînant une réduction non négligeable de la concentration d' O_3 dans la couche limite par rapport à celle de la chambre ($CO_{3bl} < CO_{3s}$). Les deux erreurs possibles ($CO_{3bl} < CO_{3s}$ et $C^iO_3 > 0$) causeront ensemble une surestimation de ΦO_{3gs} à cause d'une surestimation du gradient de l' O_3 à travers les stomates ($((CO_{3bl} - C^iO_3) \ll (CO_{3s} - 0))$) et en conséquence une sous-estimation du dépôt cuticulaire (Jud *et al.*, 2016). Dans notre étude comparant les différents phénotypes, il est donc important de considérer le dépôt surfacique total d'ozone ($\Phi O_{3gs} + \Phi O_{3\text{ cutic}}$) et interpréter les valeurs singulières de ΦO_{3gs} et $\Phi O_{3\text{ cutic}}$ avec prudence.

1.4. Echantillonnage et analyse des COV

Des cartouches absorbantes en acier inoxydable (Perkin Elmer, Villebon, France) contenant des polymères adsorbants poreux Tenax TA et Carbotrap ont été utilisées pour collecter les substances volatiles émises par les plantes. Ces cartouches ont été connectées à un filtre d' O_3 constitué de plusieurs couches de filets en cuivre imprégnés de MnO_2 (Christensen *et al.*, 2000) (afin d'éviter la réaction des COV piégés avec l' O_3 dans la cartouche). Les cartouches ont été connectées aux orifices d'entrée et de sortie de la chambre, l'air a été aspiré à travers l'adsorbant à l'aide d'une pompe et d'un régulateur de débit massique pendant 30 min à un débit de 300 ml min^{-1} . Les cartouches sont ensuite conservées au congélateur à -20°C jusqu'aux analyses. A la fin de l'expérimentation, et après avoir mesuré les teneurs en chlorophylle avec le SPAD et la fluorescence de la chlorophylle, la totalité des feuilles et de la tige de la plante ont ensuite été récoltées, scannées avec un scanner photo Epson perfection V800, et leurs surfaces a été calculées avec le logiciel Image J 5. Egalement, les dommages visibles (tâches) ont été quantifiés et estimés par le même logiciel (voir ci-dessous). Le poids sec total des feuilles de la tige a été déterminé après un séchage à l'étuve (Memmert UF450) à 60°C pendant 72 heures. Les COV piégés dans les cartouches ont été analysés par le GC-MS Shimadzu QP-2010-SE équipé d'un système de désorption thermique TD-20 (Shimadzu,

CHAPITRE III

Kyoto, Japon). La méthode d'analyse, la quantification et le calcul des émissions des COV sont décrits dans le chapitre 1.

1.5. Mesure des teneurs en chlorophylle et Fv/Fm

Les teneurs en chlorophylle dans les feuilles ont été estimées avant et après l'exposition des plantes à l'O₃, par SPAD502 (Konica, Minolta, Osaka, Japon). Fv / Fm a été mesuré avec un fluorimètre PAM-2000, (WALZ, Germany) après une adaptation de 30 min à l'obscurité. Il est directement calculé et fourni par l'appareil comme (Fm-Fo) / Fm. (Fo) est le rendement de fluorescence minimum, et (Fm) est le rendement de fluorescence maximal (Li *et al.*, 2018).

1.6. Mesure des teneurs des COV après l'exposition des plantes à l'ozone

La méthode d'extraction des COV dans les feuilles était la même que celle utilisée dans la première étude (chapitre 1), sauf pour le solvant d'extraction : on a choisi le méthanol pour ses propriétés d'extraction des composés volatils et non volatils (Kang *et al.*, 2010). L'analyse et le calcul des teneurs des COV ont été également décrits dans le chapitre 1.

1.7. Quantification des dommages visibles sur les feuilles

Les dommages produites après l'exposition des plantes à l'ozone ont été quantifiées le lendemain de l'expérimentation. Etant donné qu'elles ne deviennent visibles qu'après l'exposition à l'O₃ sur des échelles de temps allant de l'heure à la journée (Behnke *et al.*, 2009). Les dégâts ont été analysés par image J, en utilisant le Plugin Analyze particle (voir annexe 3-2).

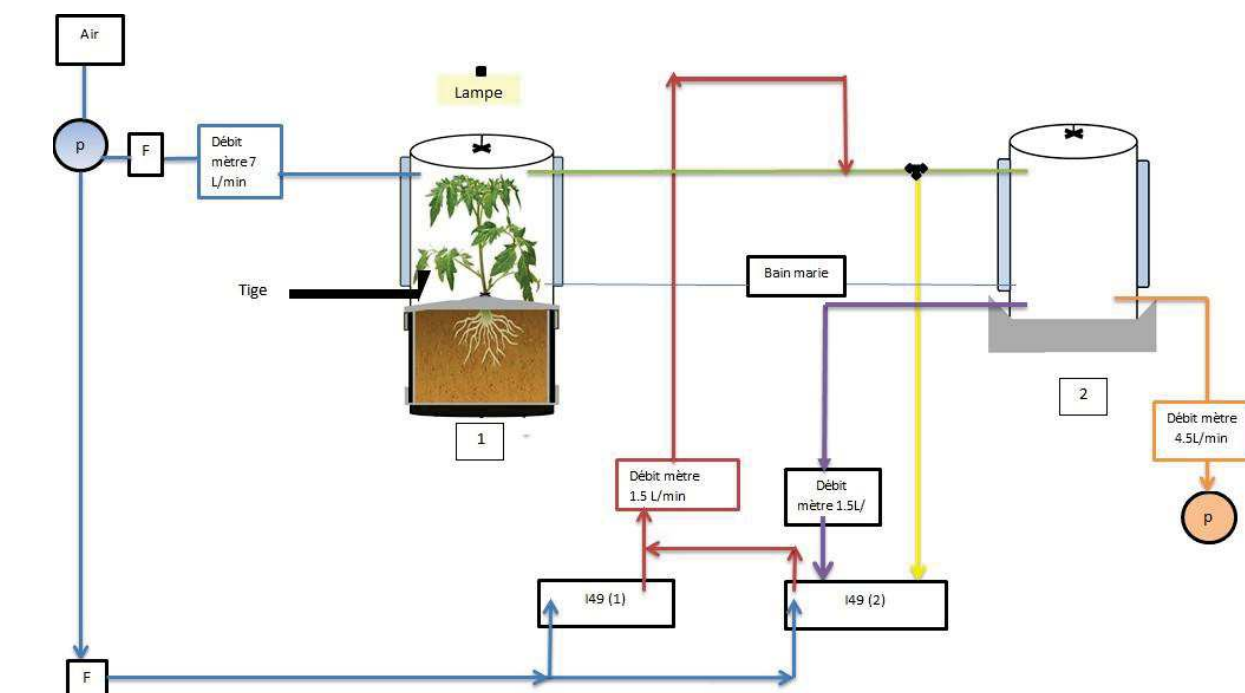
1.8. Mesure de dépôt d'O₃ chimique après application d'un stress mécanique sur la plante

Afin d'évaluer l'amplitude du dépôt d'O₃ chimique, celui-ci a été mesuré après application d'un stress mécanique sur la plante visant à faire exploser les trichomes et les émissions des COV. Cette expérimentation supplémentaire a été réalisée sur Castelmart et son mutant Odorless qui représentent les deux génotypes les plus contrastés en termes d'émissions et de teneurs foliaires en COV.

La plante a été installée la veille de la mesure comme dans la précédente expérimentation, dans les mêmes conditions environnementales (température, lumière, [CO₂], sauf qu'uniquement la chambre vide a été fumigée par l'O₃ (chambre de réaction des COV de l'air

CHAPITRE III

de la plante transféré avec l' O_3) (figure 4). Elle a été fumigée par 100 ppb d' O_3 pendant 30 minutes. Puis un stress mécanique a été appliqué sur la plante (feuilles et tige) à l'aide d'une tige insérée dans une sortie de la chambre plante (figure 4) pendant 3 min. (sans ouverture de la cloche). À ce stade $[O_3]$ a été enregistrée à l'entrée et à la sortie de la chambre de réaction pendant 30 minutes.



1 : chambre plante

2 : chambre de réaction des COVs émis par la plante avec l' O_3

- Air ambiant filtré
- Air de la cloche 1 transféré à la cloche 2
- Air enrichi avec l'ozone dans la chambre 2
- Mesure de $[O_3]$ à l'entrée de la cloche 2
- Mesure de $[O_3]$ à la sortie de cloche 2
- Air aspiré de la cloche 2

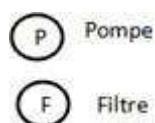


Figure 4. Mesure de dépôt d' O_3 chimique après application d'un stress mécanique sur la plante.

1.9. Traitement et analyse des données

Les résultats de cette étude sont exposés en 4 parties, sous forme des comparaisons binaires entre les deux génotypes de MACIC tom, puis entre chaque parent et son mutant. Le test de student a été effectué pour comparer les différents dépôts d' O_3 mesurés et calculés, les

CHAPITRE III

échanges gazeux, les teneurs en chlorophylle, Fv/Fm, les dommages physiques et les émissions et teneurs des COV. Avant la réalisation du test, la normalité et homogénéité des distributions des résidus ont été examinées par le test shapiro-wilk et levene respectivement. Le test n'est pas appliqué en cas d'absence totale d'une variable. Des régressions linéaires et non linéaires ont été testées pour analyser les relations entre les dépôts d'O₃, les mesures écophysiologicals et les émissions de COV. En raison du nombre réduit de répétitions (n=5-6 pour la mesure des dépôts d'O₃ et les mesures écophysiologicals, n=3 pour les émissions et les teneurs de COV), les différences sont considérées significatives comme suit : P > 0.1 : non-significative, * : P ≤ 0.05-0.1, les différences sont considérées comme marginalement significative, ** : P ≤ 0.05-0.01, différence significative, *** ≤ 0.01-0.001 très significative. Afin de comparer les trois mutants entre eux, une Anova a été réalisée.

2. Résultats

2.1. Comparaison entre Cervil et LA0147

Les deux génotypes Cervil et LA0147 sont deux des huit parents de la population magic tom de tomate issus des accessions *lycopersicum esculutum* var. *cerasiforme* et *lycopersicum esculutum*, respectivement. Leurs émissions et les teneurs en COV constitutifs ont été analysés dans le chapitre 1. Ils ont été choisis pour leurs émissions contrastées de COV (principalement mono et sesquiterpènes). La somme des émissions de COV chez Cervil était de $5.09 \pm 0.45 \text{ ng m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tandis que celle de LA0147 était 3 fois supérieures, $15.70 \pm 1.42 \text{ ng m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ surface des plantes (chapitre 1). Les teneurs en COV dans les tissus étaient de 44.7 ± 5.3 et $95.6 \pm 18 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ poids frais de feuilles chez Cervil et LA0147, respectivement (chapitre 1). Le LMA était de 17.85 ± 0.89 et $23.28 \pm 0.75 \text{ g m}^2$ chez Cervil et LA0147, respectivement. Cervil avait des petites folioles et semblait avoir (visuellement) une densité faible de trichomes par rapport à LA0147. Cette étude a donc pour objectif d'examiner le rôle des émissions de COV constitutifs (indépendamment des trichomes) dans le dépôt d'O₃ chimique des deux génotypes, et leurs rôles dans la résistance ou la sensibilité au stress oxydatif. (Suite à des raisons techniques, les mesures des émissions et les teneurs des COV lors et après l'exposition des plantes à l'O₃ respectivement n'ont pas été réalisés).

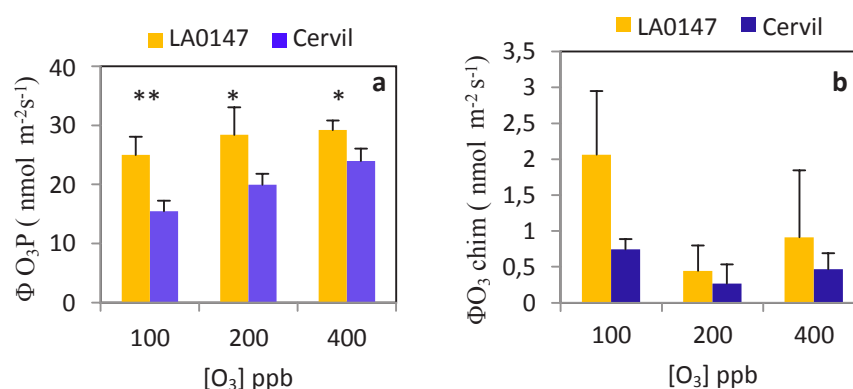
CHAPITRE III

Tableau 1. Concentrations d'O₃ auxquelles LA0147 et Cervil étaient exposées au cours de l'expérimentation, [O₃]e et [O₃]s sont les concentrations d'O₃ à l'entrée et à la sortie de la cloche respectivement durant les 3 étapes de fumigation de la plante avec l'O₃. Les moyennes représentent 3 répétitions ± SEM. P représente la différence de [O₃]e entre les deux génotypes pour chaque concentration d'O₃ appliquée.

[O ₃] ppb	génotypes	[O ₃]e	[O ₃]s	P [O ₃]e
100	LA0147	277.8±50.12	99.6±2.17	0.12
	Cervil	198.9±15.26	97.25±5.50	
200	LA0147	412.02±65.31	201.63±3.51	0.24
	Cervil	337.00±31.33	200.58±3.72	
400	LA0147	621.24±18.09	397.92±14.71	0.02
	Cervil	563.58±7.18	398.17±13.14	

A chaque niveau d'O₃, les [O₃]e étaient supérieures chez LA0147 et significativement différentes entre les deux génotypes à 400 ppb (P=0.02) (tableau 1). Les surfaces de plantes exposées à l'O₃ étaient de 0.03±0.006 m² et 0.03±0.004 m² pour LA0147 et Cervil respectivement (P=0.51).

2.1.1. Différents dépôts d'ozone



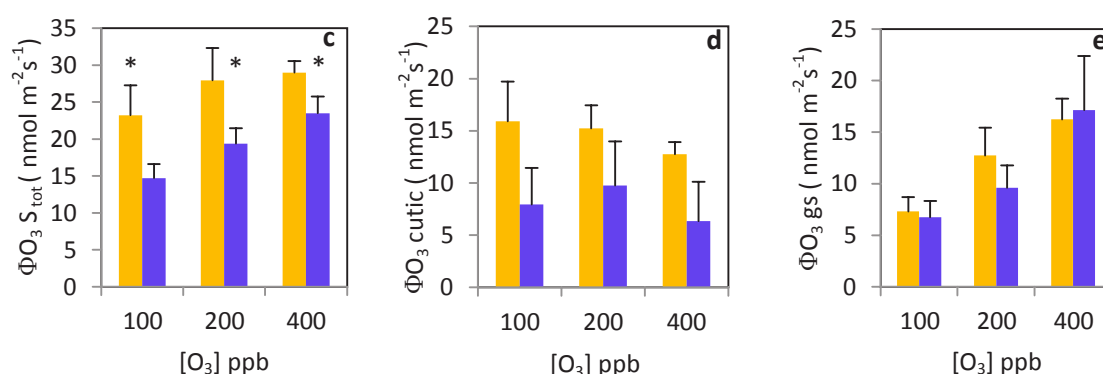


Figure 5. Changement des dépôts d'O₃ chez Cervil et LA0147 en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O₃e. Les graphes a et b montrent le dépôt d'O₃ total plante : $\Phi O_3 P$ et le dépôt d'O₃ chimique : ΦO_{3chim} mesuré dans les chambres « plante » et « réaction » respectivement. Les graphes c, d et e montrent les dépôts calculés, soit le dépôt d'O₃ surfacique totale : $\Phi O_3 S_{tot}$, le dépôt d'O₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} et le dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_3 gs$ (n=3±SEM), * : P≤0.1, ** : P≤0.05, *** : P≤0.01, test de student.

Tout de dépôt d'O₃ plante et dépôt d'O₃ surfacique total étaient supérieur chez LA0147 et a différé significativement à 100 ppb et marginalement aux autres concentrations [O₃], tandis que le dépôt d'O₃ chimique était légèrement supérieur chez LA0147 mais n'a pas différé significativement entre les deux génotypes (figure 5).

2.1.2. Pourcentages de dépôt d'O₃ cuticulaire, de dépôt d'O₃ stomatique, et de dépôt d'O₃ chimique

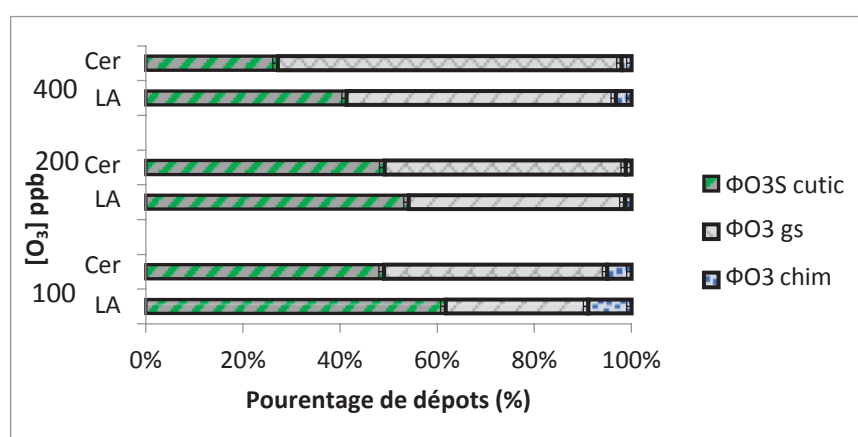


Figure 6. Pourcentages de dépôt d'O₃ cuticulaire : $\Phi O_3 S_{cutic}$, dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_3 gs$ et dépôt d'O₃ chimique : $\Phi O_3 chim$ par rapport au dépôt plante chez LA0147 et Cervil, LA : LA0147, Cer : Cervil (n=3± SEM).

CHAPITRE III

Le pourcentage de ΦO_3_{chim} représentait à l'exposition des plantes à 100 ppb entre 8.9% et 5% chez LA0147 et Cervil respectivement ($P=0.38$) et il diminuait avec l'augmentation de $[O_3]$. À 400 ppb, le pourcentage de ΦO_3_{cutic} était supérieur chez LA0147 (41.35%) que chez Cervil (27.15%), tandis que ΦO_3_{gs} était de 55.40 et 70.80% chez LA0147 et Cervil respectivement ($P=0.32$). A ce stade ΦO_3_{chim} ne représentait que 3 et 2% chez LA0147 et Cervil ($P=0.67$) (figure 6).

2.1.3. Photosynthèse (A), conductance stomatique (gs)

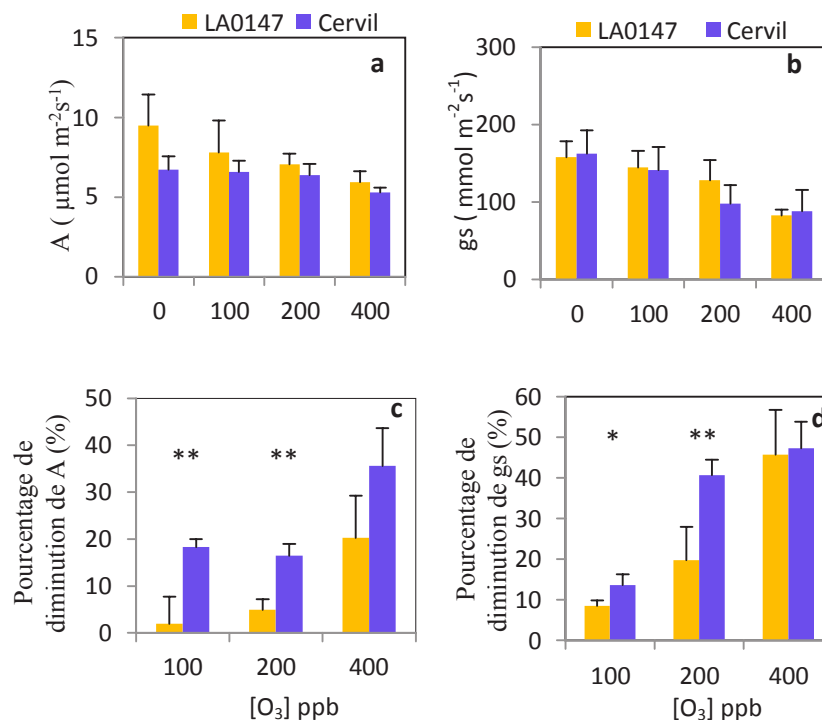


Figure 7. Changement de conductance stomatique (gs) et de photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d' O_3 chez LA0147 et Cervil en valeurs absolues (a, b) et en valeurs relatives (c, d) exprimées en pourcentage des valeurs observées en conditions contrôles $[O_3] = 0$ ppb ($n=3 \pm SEM$). Test de student : * : $P \leq 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$.

gs et A ont diminué de manière linéaire au cours de l'augmentation $[O_3]$ auxquelles les plantes étaient exposées chez les deux génotypes. Comparé aux valeurs avant exposition, gs a diminué chez LA0147 et Cervil respectivement, de 8.51 ± 1.36 % et 13.61 ± 2.69 % à 100 ppb ($P=0.09$), de 19.81 ± 8.11 % et 40.70 ± 3.81 % à 200 ppb, ($P=0.03$), et de 45.78 ± 11.02 et 47.28 ± 6.55 à 400 ppb ($P=0.88$). Après exposition des plantes à 100 ppb, A a diminué de 1.92 ± 1.68 % et 18.31 ± 5.79 % chez LA0147 et Cervil respectivement ($P=0.02$), à 200 ppb, ce pourcentage a augmenté de 4.92 ± 2.25 % et 16.43 ± 2.53 % ($P=0.01$). À la fin de

CHAPITRE III

l'expérimentation, il était de $20.27 \pm 8.03\%$ et $35.57 \pm 8.96\%$ chez LA0147 et Cervil ($P=0.18$) (figure 7).

Les teneurs en chlorophylle avant l'exposition des plantes à l' O_3 étaient de 30.03 ± 1.36 et 27.50 ± 0.67 SPAD ($P=0.09$), F_v/F_m était 0.82 ± 0.01 et 0.81 ± 0.01 ($P=0.52$) chez LA0147 et Cervil respectivement. Après l'exposition des plantes au stress, leur changement et diminution n'ont pas différé entre les deux génotypes. Le pourcentage de la surface des feuilles endommagées n'a pas différé entre les deux génotypes, et était de $25.42 \pm 3.94\%$ et $29.17 \pm 2.22\%$ de la surface total chez LA0147 et Cervil ($P=0.38$).

Cette étude avait pour objectif d'examiner le rôle des émissions des COV constitutifs, dans le dépôt d' O_3 chimique et la réponse des plantes au stress oxydatif causé par l' O_3 . Le dépôt d' O_3 chimique n'était pas différent entre les deux génotypes, malgré que les émissions constitutives des COV chez LA0147 étaient à peu près 3 fois supérieures à celles de Cervil. Cela montre que ces émissions jouent un rôle mineur dans le dépôt d' O_3 chimique. En effet, les émissions de COV terpéniques des plantes de tomate sont faibles (nos résultats du chapitre 1) dans les conditions naturelles. Mais les COV sont stockés en plus grandes quantités dans les feuilles de LA0147 par rapport à Cervil. Ce qui a permis un dépôt d' O_3 plante supérieur chez LA0147.

CHAPITRE III

2.2. Comparaison entre les parents sauvages et leurs mutants

Rappel des principales caractérisations des génotypes : émissions et teneurs des COV constitutives- caractéristiques des trichomes

Les émissions des COV constitutifs et les teneurs extraites des surfaces des feuilles, les densités des trichomes des parents et des mutants discutées dans le chapitre 2 sont décrites dans les tableaux ci-dessous (tableau 2et 3 respectivement).

Tableau 2. Émissions des COV constitutifs et les teneurs extraites des surfaces des feuilles des parents sauvages et leurs mutants (n=3±SEM). MNT : monoterpènes, SQT : sesquiterpènes. P représente les différences entre chaque parent et son mutant (test de student).

Génotypes	Emissions des COV ng m ⁻² s ⁻¹						Teneur des COV µg g ⁻¹					
	MNT	P	SQT	P	Somme	P	MNT	P	SQT	P	Somme	P
Castelmart	33.72±2.39	0.0003	2.36±0.97	0.25	36.08±2.03	0.0002	204.88±126.06	0.01	18.69±19.35	0.17	233.17±143.70	0.01
Odorless	4.74±2.03		1.27±0.46		6.01±2.27		0		0		0	
Alisa craig	23.17±4.36	0.12	1.20±0.32	0.02	24.56±4.32	0.09	91.28±39.11	0.09	9.12±4.39	0.88	100.44±39.55	0.08
GCR337	15.37±4.51		0.42±0.20		16.02±4.40		33.57±17.55		9.75±4.87		43.32±12.83	
Maofen B02	19.50±5.86	0.04	1.36±0.16	0.01	20.86±5.82	0.03	39.35±17.70	0.2	9.64±4.18	0.08	48.99±15.44	0.05
Maofen B02*	5.69±1.34		0.40±0.20		6.1±1.46		20.19±7.21		2.45±2.80		22.64±4.38	

Tableau 3. Comparaison des densités de trichomes glandulaires (TG) et de trichomes non glandulaires (TNG) entre les parents et leurs mutants (la densité dans nos observations a été examinée visuellement). (Voir chapitre 2, pour des informations supplémentaires).

Densité des TG	Références	Densité des TNG	Références
Odorless < Castelmart	Kang et al.,2012		
GCR 337 < Alisa craig	Kang et al.,2010	GCR 337 = Alisa craig	Kang et al.,2010
Maofen B02 <Maofen B02*	nos observations	Maofen B02 M> Maofen B02 P	nos observations

CHAPITRE III

Concentrations d'O₃ appliquées

Tableau 4. Concentrations d'O₃ auxquelles les parents et leurs mutants étaient exposées au cours de la fumigation aux 4 [O₃] appliquées. P représente la différence entre chaque couple de génotypes (n=5-6±SEM), test de student.

Génotypes	100 ppb	p	200 ppb	P	400 ppb	P	600 ppb	P
Castelmart	27±5.7	0.03	48.11±12.86	0.009	121±26.49	0.02	232±71.3	0.07
Odorless	36.8±4.31		71±7		159.38±13.72		308.77±21.8	
Ailsa craig	31.93±9.01	0.17	61.54±16.43	0.06	160.78±42.30	0.24	295.49±60.85	0.25
GCR337	41.65±8.45		91.20±21.86		202.89±51.10		348.39±59.52	
Maofen B02	32.26±6.82	0.32	69±17	0.51	167±30	0.77	338±29	0.25
Maofen B02*	37.50±5.60		75.6±7.25		173±30		334± 33	

Ce tableau montre les différences en [O₃] auxquelles les plantes étaient exposées entre chaque couple de génotypes. Les [O₃] entrée étaient fixées pour tous les génotypes à (100, 200, 400, 600) ±10 ppb.

Dans les parties ci-dessous, je présente les comparaisons entre chaque parent sauvage et son mutant séparément, des dépôts d'O₃, des changements de A et gs et des émissions de COV en fonction des 4 niveaux d'O₃ appliqués. Cependant, le changement des teneurs en chlorophylle, Fv/Fm, les différences en lésions et dommages visibles, et les teneurs des COV analysées à la fin de l'expérimentation sont regroupés pour les 3 couples à la fin des comparaisons deux à deux.

2.2.1. Comparaison entre Castelmart et son mutant Odorless

Le mutant Odorless a été exposé à des concentrations d'O₃ supérieures à celles de Castelmart (voir tableau 4). Les surfaces des feuilles et tiges des plantes n'étaient pas significativement différentes entre les deux génotypes (P=0.11), et étaient en moyenne de 0.04±0.01 m² chez Castelmart et 0.03±0.005 m²chez Odorless.

CHAPITRE III

2.2.1.1. Différents dépôts d'O₃

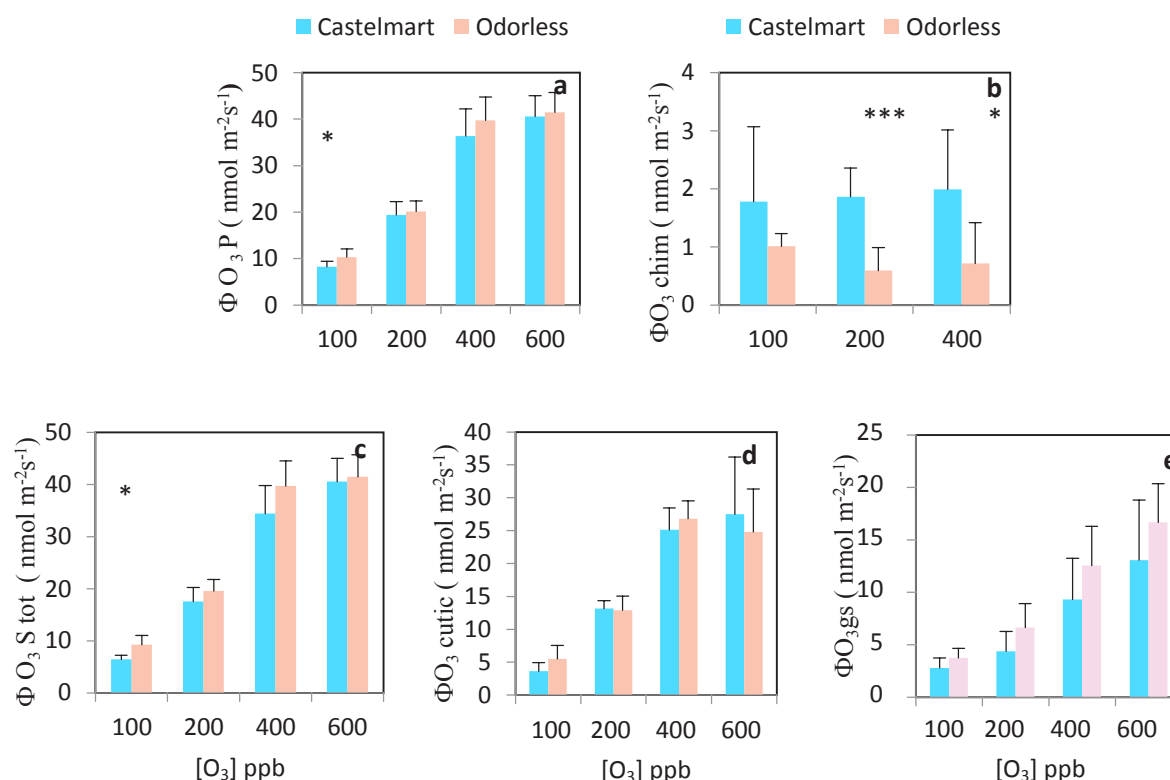


Figure 8. Changement des dépôts d'O₃ chez Castelmart et son mutant Odorless en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O₃e. Les graphes a et b montrent le dépôt d'O₃ total plante : $\Phi O_3 P$ et le dépôt d'O₃ chimique : $\Phi O_{3\text{chim}}$ mesuré dans les chambres « plante » et « réaction » respectivement. Les graphes c, d et e montrent les dépôts calculés, soit le dépôt d'O₃ surfacique totale : $\Phi O_3 S_{\text{tot}}$, le dépôt d'O₃ cuticulaire : $\Phi O_{3\text{cutic}}$ et le dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_3 \text{ gs}$ (n=6±SEM), * : P≤0.1, ** : P≤0.05, *** : P≤0.01, test de student.

Tous les dépôts d'O₃ mesurés et calculés ont augmenté chez les deux génotypes avec l'augmentation des concentrations d'O₃. Le $\Phi O_3 P$ était légèrement supérieur chez Odorless, mais les différences ne sont pas significatives à part une tendance à 100 ppb (P=0.1) (figure 8). Entre 100 et 600 ppb d'O₃, il augmentait de 8.21±1.17 à 40.55±4.49 nmol m⁻²s⁻¹ chez Castelmart et de 10.27±1.83 à 41.47±4.24 nmol m⁻²s⁻¹ chez Odorless. Le $\Phi O_{3\text{chim}}$ était élevé chez Castelmart, et significativement différent entre les deux génotypes à 200 et 400 ppb, (P=0.005 et 0.09, respectivement). Le $\Phi O_3 S_{\text{tot}}$ (dépôt plante – le dépôt chimique) était tendanciuellement supérieur chez Odorless, tandis que le dépôt d'O₃ cuticulaire était comparable entre les deux génotypes. Le $\Phi O_3 \text{ gs}$ moyen était légèrement supérieur chez Odorless, mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux génotypes. Les

CHAPITRE III

résultats de différents dépôts d'O₃ mesurés et calculés ont montré que c'est principalement le $\Phi O_{3\text{chim}}$ qui fait la différence entre les deux génotypes. En outre, malgré qu'il fût plus faible chez Odorless, son $\Phi O_{3S\text{tot}}$ était tendancielllement supérieur à 100 ppb.

2.2.1.2. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire, de dépôt d'O₃ stomatique, et de dépôt d'O₃ chimique

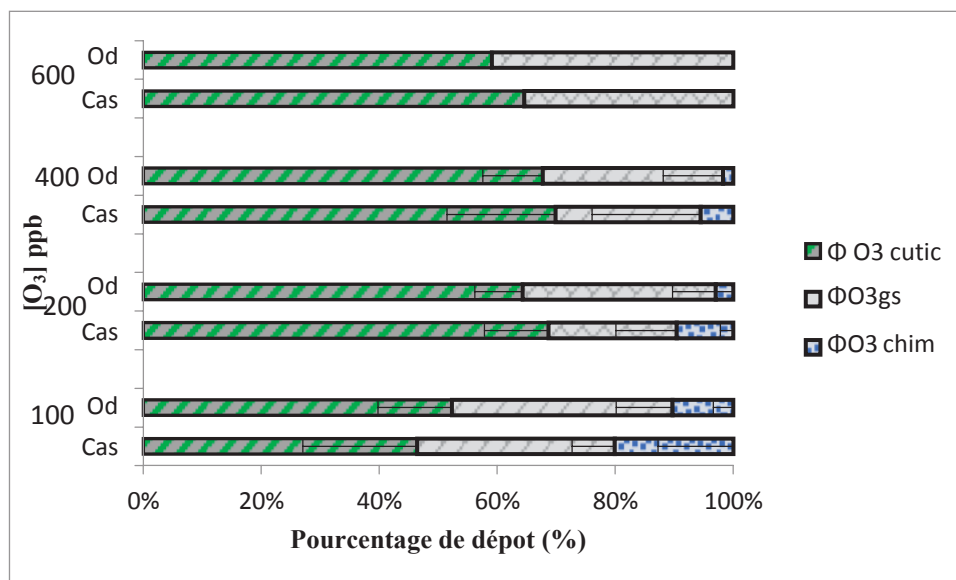


Figure 9. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire : $\Phi O_{3\text{cutic}}$, dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_{3\text{gs}}$ et dépôt d'O₃ chimique : $\Phi O_{3\text{chim}}$ chez Castelmart et Odorless, Cas : Castelmart, od : Odorless (n=6±SEM).

Globalement, la contribution du $\Phi O_{3\text{chim}}$ au dépôt total est faible et devient insignifiante à 400 ppb malgré une différence entre les deux génotypes. Le $\Phi O_{3\text{gs}}$ et le $\Phi O_{3\text{cutic}}$ ne sont pas différents entre les deux génotypes à par une différence marginale de $\Phi O_{3\text{gs}}$ à 200 ppb (P=0.09) (n=6, test de student).

CHAPITRE III

2.2.1.3. Photosynthèse (A) et conductance stomatique (g_s)

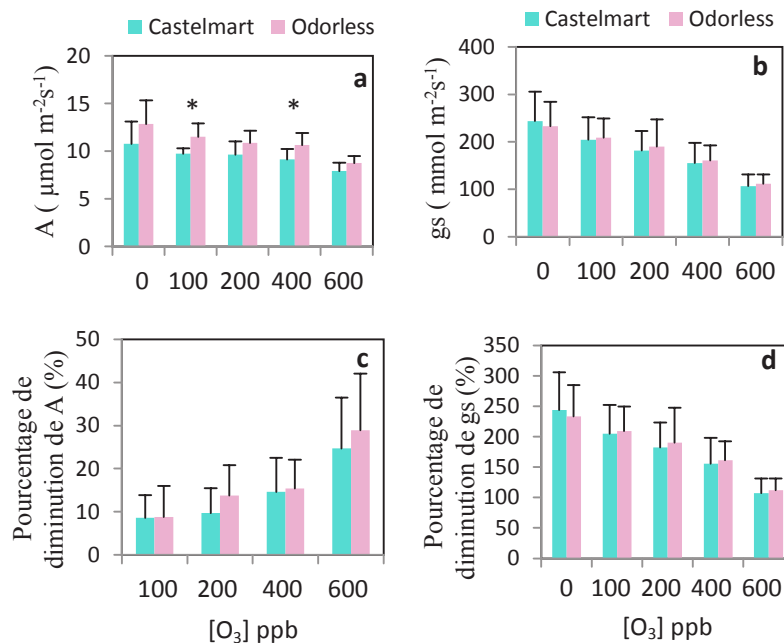


Figure 10. Changement de la conductance stomatique (g_s) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation [O₃] chez Castelmart et Odorless en valeurs absolues (a, b) et en valeurs relatives (c, d) exprimées en pourcentage par rapport aux conditions contrôles [O₃] = 0 ppb (n=6 ± SEM). Test de student : * : P ≤ 0.1, ** : P ≤ 0.05, *** : P ≤ 0.01. Le rapport LMA (de l'ensemble des feuilles et tige) était supérieur chez Odorless par rapport à son parent, et il était en moyenne de 30.61 ± 1.81 et 36.24 ± 2.58 (g m²) chez Castelmart et Odorless, respectivement (P=0.0006).

Avant l'exposition des plantes à l'O₃, g_s était en moyenne de 243.72 ± 61.80 et de 323.92 ± 2.47 (mmol m⁻²s⁻¹) chez Castelmart et Odorless, respectivement (P=0.55). A était de 10.78 ± 2.32 et 12.86 ± 2.47 (μmol m⁻²s⁻¹) chez Castelmart et Odorless, respectivement (P=0.21). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux génotypes, cela montre que la mutation ne les a pas affectées chez Odorless. Au cours de l'exposition des plantes à l'O₃, A et g_s diminuent de manière linéaire avec l'augmentation de [O₃]. A était légèrement supérieure chez Odorless avec une différence légèrement significative entre les deux génotypes à 100 et 400 ppb, * : P ≤ 0.1 (figure). Une réduction linéaire de A et de g_s a été remarquée chez les deux génotypes, et aucune différence significative n'a été observée entre les deux génotypes.

CHAPITRE III

2.2.1.4. Emissions de COV après l'exposition des plantes au stress oxydatif

Les émissions de COV majeurs α -pinène, β -phellandrène, β -caryophyllène, p-cymène, α -terpiniol et α -phellandrène ont été détectées avant l'exposition des plantes à l' O_3 avec un faible taux d'émission, puis ces COV ont disparus suite à l'exposition des plantes à l' O_3 sauf α -pinène (voir tableau 2, annexe 3). 18 COV ont été détectés dans le mélange des émissions des COV des plantes exposées à l' O_3 . Ce mélange comprend principalement 6 COV LOX (C_6) : 2,3, butanediol, pentanal, hexanal, 3,4, hexanedione, l'acide valérique et l'acide hexanoïque. Deux COV alcools : 2-éthylhexanol, phenoxethol ; un éthyl benzène et ses dérivés : l'acide benzoïque et l'acétophénone, des COV aldéhydes : heptanal, octanal, undecanal, dodecanal et tridecanal, des acides gras : l'acide dodécanoïque et l'acide hexadécanoïque (voir annexe 3 pour émissions des COV individuels, tableau 2).

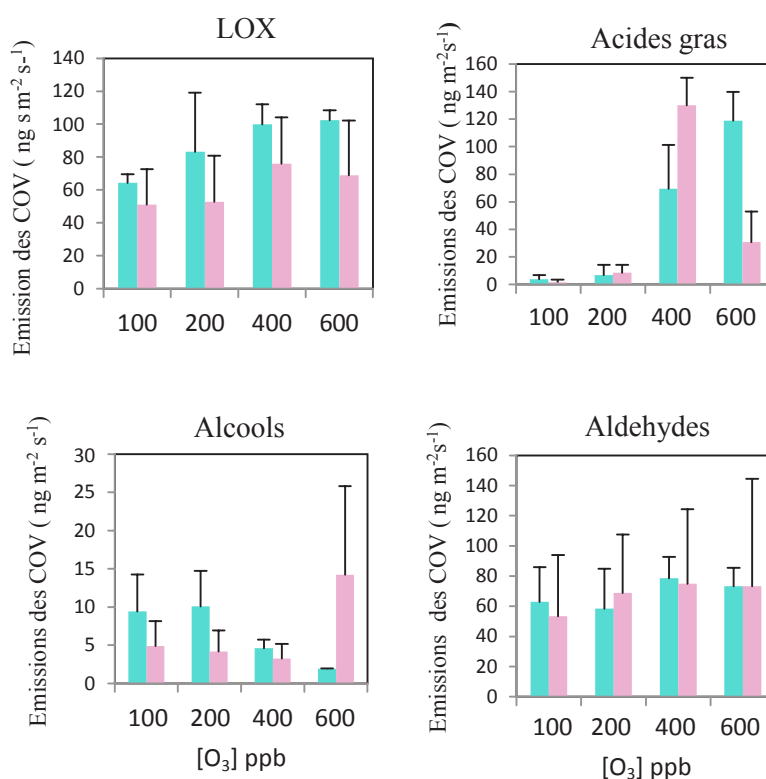


Figure 11. Emissions des COV des deux géotypes Castelmart et Odorless ng m⁻²s⁻¹ surface de plante projetée (n=3±SEM) pour chaque niveau de [O₃] appliqué. Test de student. * : P<0.1, ** : P≤0.05, *** : P≤0.01.

La somme des émissions des LOX était légèrement supérieure chez Castelmart, mais aucune différence n'a été trouvée entre les deux géotypes. La somme de ces COV était de 102.37±6.04 et 69.02±33.23 ng m⁻²s⁻¹ chez Castelmart et Odorless respectivement à la fin de

CHAPITRE III

l'expérimentation ($P=0.42$). La somme des deux acides gras saturés acide dodécanoïque et acide hexadécanoïque était de 1.51 ± 2.01 et $3.77 \pm 3.04 \text{ ng m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, et augmentait à 600 ppb à 118.90 ± 20.86 et $30.66 \pm 22.27 \text{ ng m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ chez Castelmart et Odorless respectivement ($P=0.1$). L'émission des COV alcools était de 9.39 ± 4.84 et $4.89 \pm 3.26 \text{ 100 ppb}$ ($P=0.40$), elles diminuent à 1.91 ± 0.01 chez Castelmart mais augmentaient à 14.20 ± 11.00 chez Odorless à 600 ppb. Les émissions des aldéhydes étaient quasi similaires à celles des LOX et comparables entre les deux génotypes (figure 11).

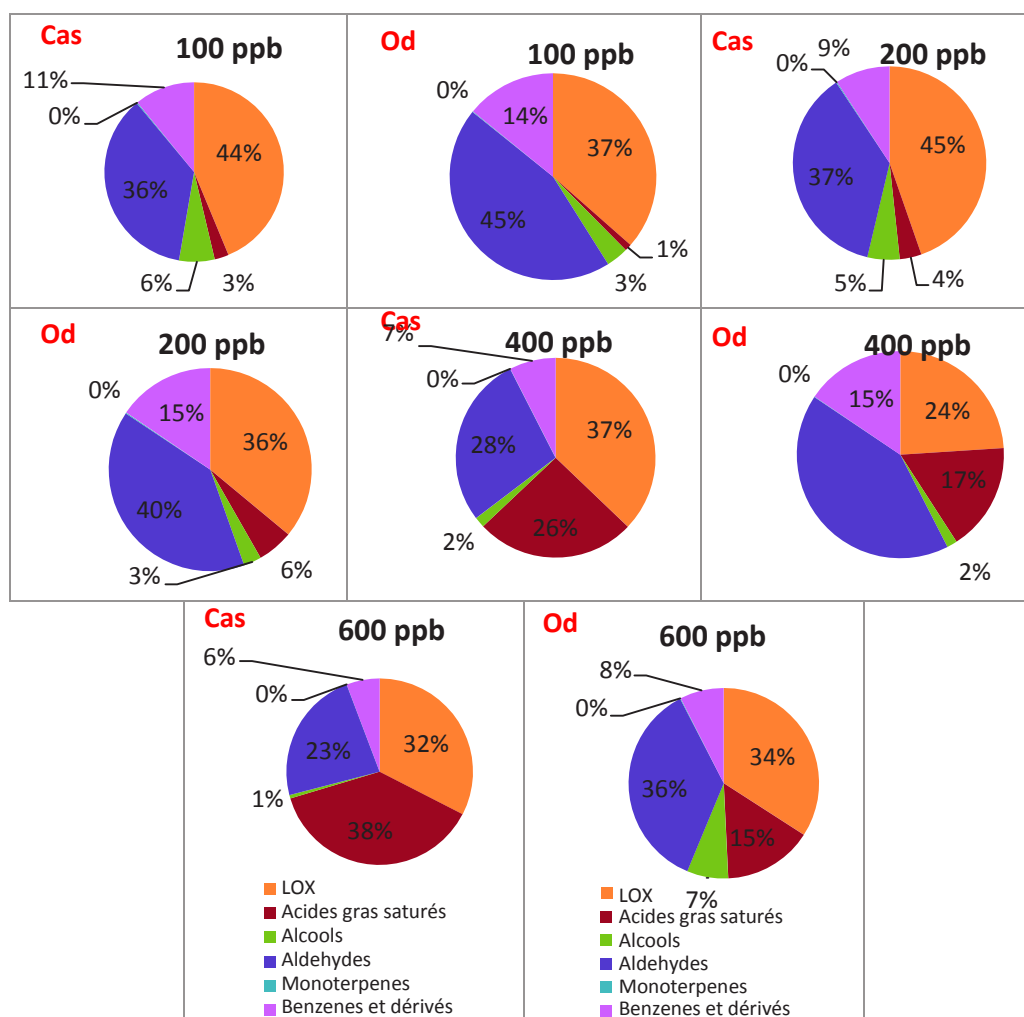


Figure 12. Pourcentage des émissions des différentes classes des COV émis au cours de l'exposition de Castelmart et Odorless à l' O_3 : LOX, acides gras saturés, alcools, aldéhydes, monoterpènes et benzènes et ses dérivés chez Castelmart et Odorless. Cas: Castelmart, Od : Odorless.

Globalement, Au cours de la fumigation des plantes avec l' O_3 , les émissions des LOX et des aldéhydes représentaient le pourcentage le plus élevé des émissions totales de COV, tandis que les dérivés de benzènes et les alcools représentaient un pourcentage d'émission faible. A

CHAPITRE III

100 ppb d'O₃, une légère différence du pourcentage des émissions de LOX (7%) a été trouvée entre les deux génotypes, qui augmente à 9% et 13% suite à la fumigation des plantes avec 200 et 400 ppb d'O₃. A partir de 400 ppb d'O₃, le pourcentage d'acides gras saturés augmente principalement chez le parent Castelmart et il représente 26% et 38 % à 400 et 600 ppb respectivement contre 17% et 15% chez Odorless. A 600 ppb, les émissions de COV aldéhydes représentaient le pourcentage le plus élevé (figure 12).

2.2.1.5. Dépôt d'O₃ chimique dans la chambre de réaction des COV avec l'O₃ suite à un stress mécanique sur les deux génotypes

L'objectif est d'évaluer le rôle de $\Phi O_{3\text{chim}}$ dans la destruction d'O₃ et confirmer le faible rôle des COV constitutifs dans ce $\Phi O_{3\text{chim}}$ dû aux faibles niveaux d'émissions de COV en conditions naturelles. On a donc mesuré le dépôt d'O₃ chimique après une application d'un stress mécanique dans le but de stimuler les trichomes et les émissions de COV.

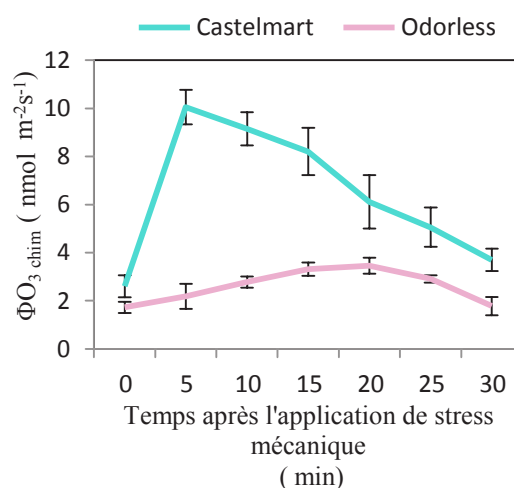


Figure 13. Dépôt d'O₃ chimique $\Phi O_{3\text{chim}}$ en application de stress mécanique nmol m⁻²s⁻¹ pendant une fumigation des plantes avec 100 ppb d'O₃ (n=3 ± SEM). $\Phi O_{3\text{chim}}$ au temps0 représente le dépôt chimique d'O₃ avant l'application du stress mécanique (P=0.09) (n=3 ± SEM, test de student, P représente la différence entre les deux génotypes). A partir de 5 min : le dépôt d'O₃ chimique est mesuré pendant une fumigation toujours à 100 ppb d'O₃ et après application du stress mécanique sur la plante. La moyenne des 6 mesures de dépôt chimique (de 5 à 30 minutes) diffère significativement entre les deux génotypes (P=0.002).

Avant l'application du stress mécanique sur la plante, $\Phi O_{3\text{chim}}$ mesuré dans la chambre de réaction était de $2.59 \pm$ et $1.72 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ chez Castelmart et Odorless respectivement

CHAPITRE III

($P=0.09$). Après 5 minutes de stress, il a augmenté à $10 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ puis commence à diminué progressivement jusqu'à $4 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ après 30 min (la fin de mesure) chez Castelmart. Chez Odorless, $\Phi\text{O}_{3\text{chim}}$ reste presque constant après 5 min d'application de stress mécanique et a augmenté très légèrement au bout de 20 minutes, pour redescendre ensuite. Cette mesure montre que les COV émis par Castelmart ont réagi avec l' O_3 et augmenté le $\Phi\text{O}_{3\text{chim}}$, alors que ce dernier restait presque constant chez Odorless (figure 13). Cela est probablement dû à ses émissions réduites de monoterpènes et sesquiterpènes qui sont très réactifs avec l' O_3 comme décrit dans le chapitre 2. Ces résultats ont validé l'utilité de ces phénotypes pour évaluer l'importance des émissions et du stockage constitutif de terpènes volatils dans le dépôt chimique d' O_3 et leur éventuel rôle protecteur vis-à-vis de ce stress.

Globalement cette étude montre un dépôt d' O_3 chimique supérieur chez le parent Castelmart et significativement différent entre les deux génotypes à 200 et 400 ppb d' O_3 . Mais ce dépôt était beaucoup plus faible par rapport au dépôt cuticulaire et stomatique. Aucune différence significative du pourcentage de diminution de la conductance stomatique et de la photosynthèse entre les deux génotypes n'a été trouvée. Les émissions de LOX étaient légèrement plus élevées chez Castelmart mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux génotypes, sauf pour hexanal (tableau 2, annexe 3). La somme des acides gras était également supérieure chez Castelmart à la fin de l'expérimentation avec une différence marginalement significative.

2.2.2. Comparaison entre Ailsa craig et son mutant GCR337

Le parent Ailsa craig présente des trichomes glandulaires normaux, et son mutant GCR337 moins poilu présente des trichomes déformés et tordus et des émissions de COV constitutifs plus faibles. Ces deux génotypes permettent de tester l'hypothèse selon laquelle la densité de trichomes glandulaires et l'émission des COV, notamment les sesquiterpènes, pourraient améliorer la tolérance des plantes au stress oxydatif. Les $[\text{O}_3]$ auxquelles les plantes étaient exposées étaient légèrement supérieures chez le mutant (non significatif) (Tableau 4). La moyenne de surface des plantes analysées était comparable entre les deux génotypes : 0.037 ± 0.01 et 0.034 ± 0.01 chez Ailsa et son mutant respectivement ($P=0.66$).

CHAPITRE III

2.2.2.1. Différents dépôts d'O₃

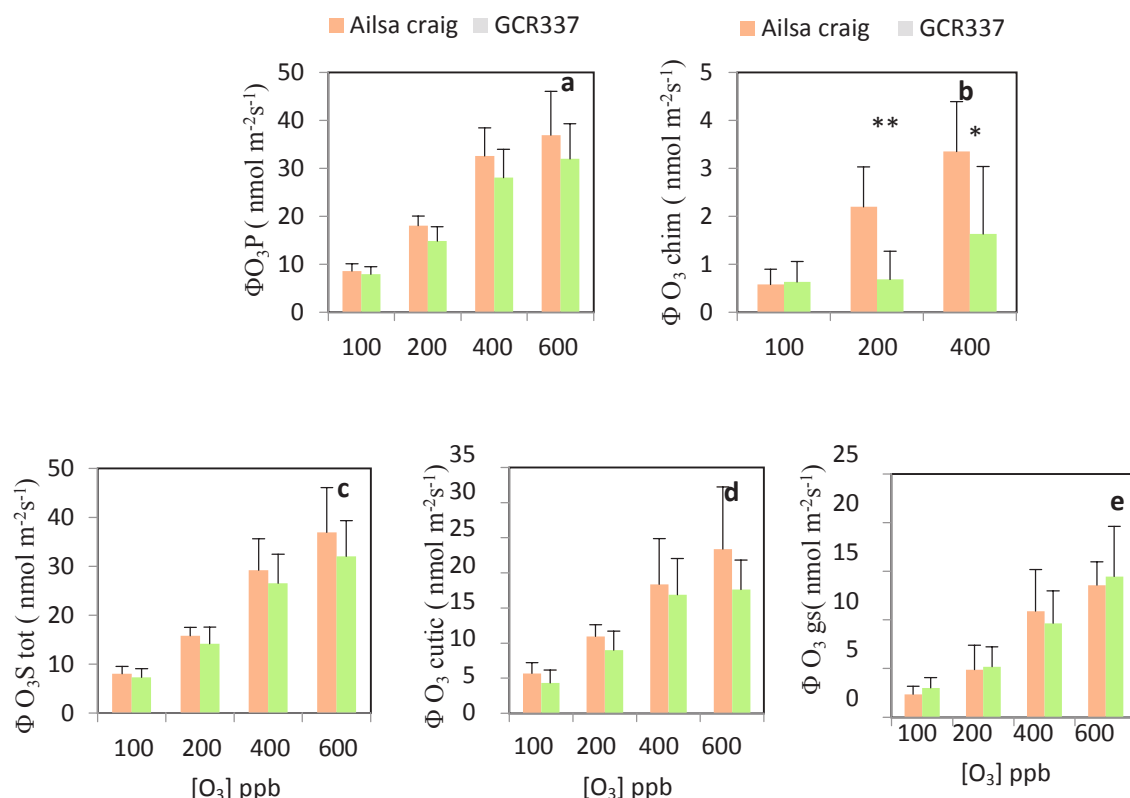


Figure 14. Changement des dépôts d'O₃ chez Ailsa craig et son mutant GCR337 en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O₃e. Les graphes a et b montrent le dépôt d'O₃ total plante : ΦO_3P et le dépôt d'O₃ chimique : $\Phi O_{3\text{chim}}$ mesuré dans les chambres « plante » et « réaction » respectivement. Les graphes c, d et e montrent les dépôts calculés, soit le dépôt d'O₃ surfacique totale : ΦO_3S_{tot} , le dépôt d'O₃ cuticulaire : $\Phi O_{3\text{cutic}}$ et le dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_3 \text{ gs}$ (n=6±SEM), * : P≤0.1, ** : P≤0.05, *** : P≤0.01, test de student.

Le ΦO_3P a augmenté entre 100 et 600 ppb de 8.61±1.53 à 36.92±9.12 chez le parent et de 7.93±1.57 à 32.03±7.28 nmol m⁻²s⁻¹ chez le mutant. Il était supérieur chez Ailsa craig mais les différences ne sont pas significatives entre les deux génotypes. Le $\Phi O_{3\text{chim}}$ était en moyenne chez le parent et son mutant de 0.57±0.32 et 0.63±0.42 nmol m⁻²s⁻¹ respectivement à 100 ppb (P=0.89), 2.20±0.82 et 0.68±0.58 à 200 ppb (P=0.01), pour atteindre 3.35±1.04 et 1.63±1.40 nmol m⁻²s⁻¹ à 400 ppb (P=0.09). Au contraire ΦO_3S_{tot} , $\Phi O_{3\text{cutic}}$ et $\Phi O_3 \text{ gs}$ n'ont pas différé entre les deux génotypes.

CHAPITRE III

2.2.2.2. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire, de dépôt d'O₃ stomatique, et de dépôt d'O₃ chimique

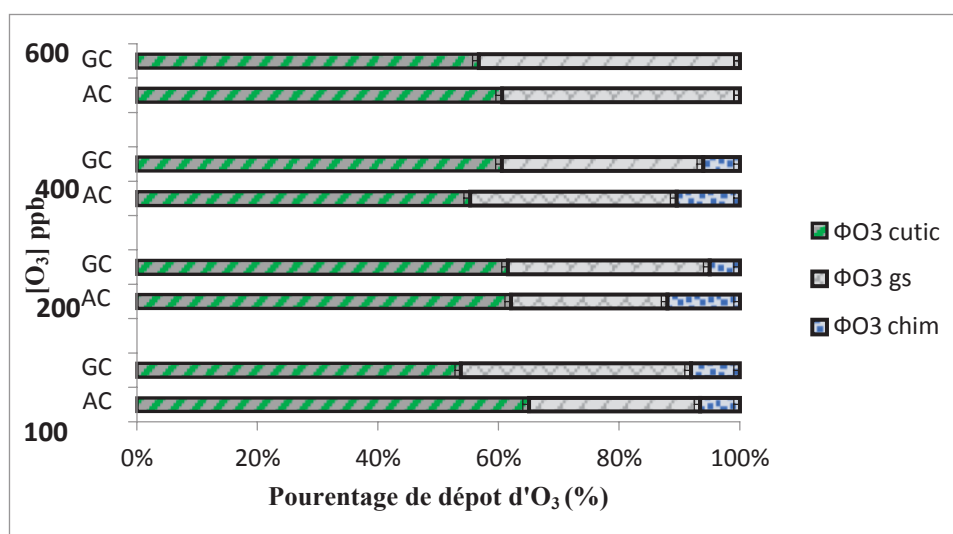


Figure 15. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O₃ chimique : ΦO_{3chim} chez Ailsa craig et GCR337, AC : Ailsa craig, GC : GCR337 (n=6±SEM).

Le ΦO_{3chim} a contribué à 6.58%±3.18 et 8.10%±5.96 du dépôt total à 100 ppb et 10.48%±5.79 et 6.08%± 5.48 à 400 ppb chez le parent et son mutant respectivement. Tandis que le ΦO_{3cutic} a représenté 65.01%±9.97 et 53.73%±15.86 du ΦO_3 P total à 100 ppb et 60.56%±9.71 et 56.67%±13.40 à 600 ppb chez Ailsa Craig et son mutant respectivement. Le dépôt d'O₃ gs a représenté 28.40%±9.81 et 38.15%±11.33 à 100 ppb, et 39.43±9.71 et 43.32±13.40 de ΦO_3 P total à 600 ppb chez Ailsa Craig et son mutant respectivement (figure 15).

CHAPITRE III

2.2.2.3. Photosynthèse (A) et conductance stomatique (gs)

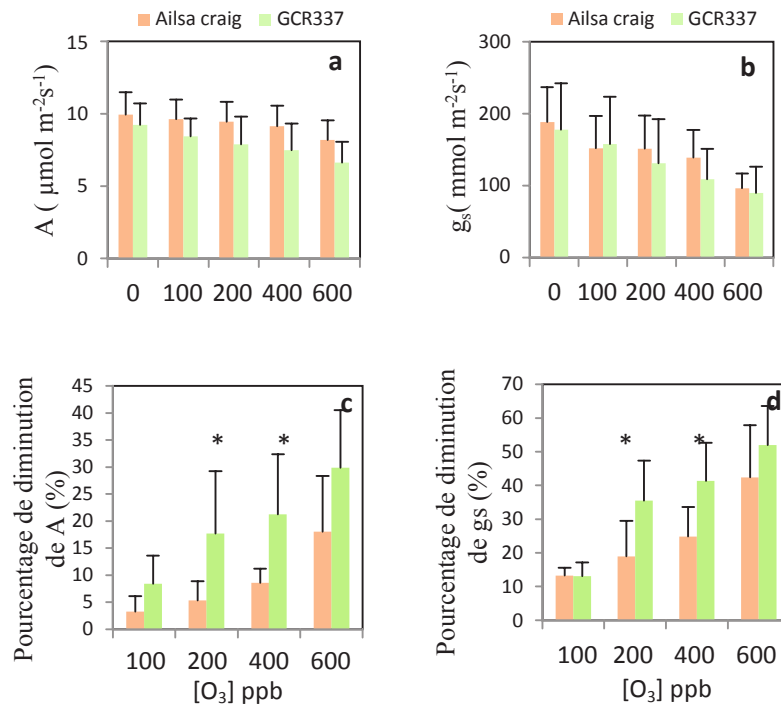


Figure 16. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d' O_3 chez Ailsa craig et GCR337 en valeurs absolues (a, b) et en valeurs relatives (c, d) exprimé en pourcentage à rapport aux conditions contrôles $[O_3] = 0$ ppb ($n=6 \pm \text{SEM}$). Test de student : * : $P \leq 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$. Le rapport LMA était en moyenne de 30.20 ± 2.31 et 28.16 ± 2.78 (g m^{-2}) chez le parent et son mutant respectivement ($P=0.32$).

En général, GCR337 avait un taux d'assimilation du CO_2 inférieur à son parent, mais la différence n'est pas significative. Le pourcentage de diminution de gs en réponse à l'augmentation des $[O_3]$ était supérieur chez le mutant GCR337 et une différence marginalement significative entre les deux génotypes a été observée à 200 et 400 ppb ($P=0.07$ et 0.05) respectivement. De la même manière, le pourcentage de diminution de A était supérieur chez le mutant GCR337 et la une différence entre les deux génotypes était marginalement significative à 200 et 400 ppb ($P=0.10$ et 0.09) respectivement (figure 16).

2.2.2.4. Emissions des COV après l'exposition des plantes au stress oxydatif

Les émissions des COV α -pinène, p-cymène, et un sesquiterpène inconnu ont été détectées avant l'exposition des plantes à l' O_3 avec un faible taux d'émission. Le sesquiterpène a disparu suite à l'exposition des plantes à l' O_3 , tandis que les deux terpènes étaient toujours

CHAPITRE III

présents, sans différence entre les deux génotypes. Le mélange d'émissions comprenait : des COV LOX dont le 2,3, butanediol, pentanal, hexanal, 3,4, hexanedione, l'acide valérique et l'acide hexanoïque ; des COV aldéhydes dont heptanal, octanal, undecanal et dodecanal ; 2 alcools, le 2-éthylhexanol et le dodécanol ; un éthyl benzène et l'un de ses dérivés, l'acide benzoïque, 2 éthyl Hexenyl benzoate et l'acétophénone ; des acides gras dont l'acide decanoïque, l'acide dodecanoïque et l'acide hexadecanoïque. La comparaison entre les émissions de COV individuels a montré chez le mutant une émission supérieure des COV suivants: 2,3, butanediol (différence significative à 200 ppb, $P=0.03$), hexanal et 2,3-hexanedione (différence significative à 400 ppb, $P=0.02$), l'acétophénone (différence significative à 400 ppb, $P=0.01$) et l'acide gras : l'acide hexadecanoïque, (différence marginalement significative à 600 ppb) (voir annexe 3, tableau 3).

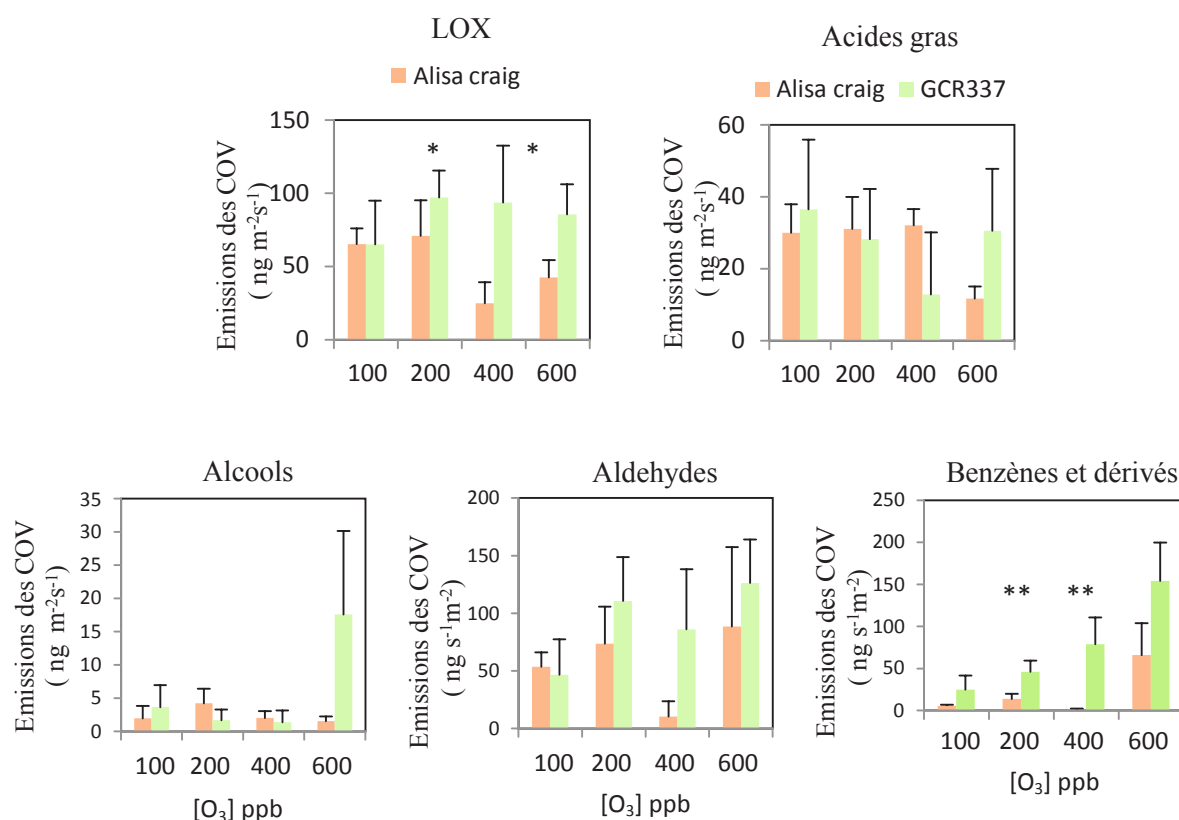


Figure 17. Emissions des COV des deux génotypes Ailsa craig et son mutant GCR337 $ng\ m^{-2}s^{-1}$ surface de la plante projetée ($n=3\pm SEM$) à chaque niveau de concentration d' O_3 appliqué. Test de student. * : $P < 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$.

Nous avons remarqué qu'à 400 ppb d' O_3 , les émissions des LOX chez Ailsa craig ont diminué et une différence marginalement significative entre les deux génotypes a été observée

CHAPITRE III

($P=0.08$ et 0.09 à 400 et 600 ppb respectivement). La somme des émissions des trois acides gras : l'acide decanoïque, l'acide dodécanoïque et l'acide hexadécanoïque était 30.03 ± 7.90 et 36.56 ± 19.31 $\text{ng m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez Ailsa et son mutant respectivement ($P=0.40$). Suite à l'exposition à 600 ppb, elle était toujours à 30.58 ± 17.24 chez le mutant, mais elle avait diminué à 11.75 ± 3.42 $\text{ng m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez Ailsa craig, la différence entre les deux génotypes n'étant pas significative en raison de la forte variabilité. L'émission des COV alcools était comparable entre les deux génotypes. La somme des émissions des aldéhydes ont suivi la même fluctuation que les LOX, mais sans différence entre les deux génotypes. Les émissions des COV dérivées des benzènes étaient toujours élevées chez le mutant et différaient entre les deux génotypes à 200 ppb d' O_3 ($P=0.04$), et 400 ppb ($P=0.03$). Elles ont augmenté à 600 ppb pour atteindre 65.69 ± 38.16 et 154.12 ± 45.54 $\text{ng m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez Ailsa Craig et GCR337 respectivement, mais cette différence n'était pas significative ($P=0.14$).

Lors de l'exposition des plantes à 100 et 200 ppb d' O_3 , les émissions des LOX et des aldéhydes représentaient le pourcentage le plus élevé des émissions des COV, suivis par les acides gras, les composés benzènes et leurs dérivées puis les alcools. La part des benzènes et de leurs dérivés augmentait chez GCR337 à 400 ppb d' O_3 et chez les deux génotypes à 600 ppb d' O_3 (figure 18).

CHAPITRE III

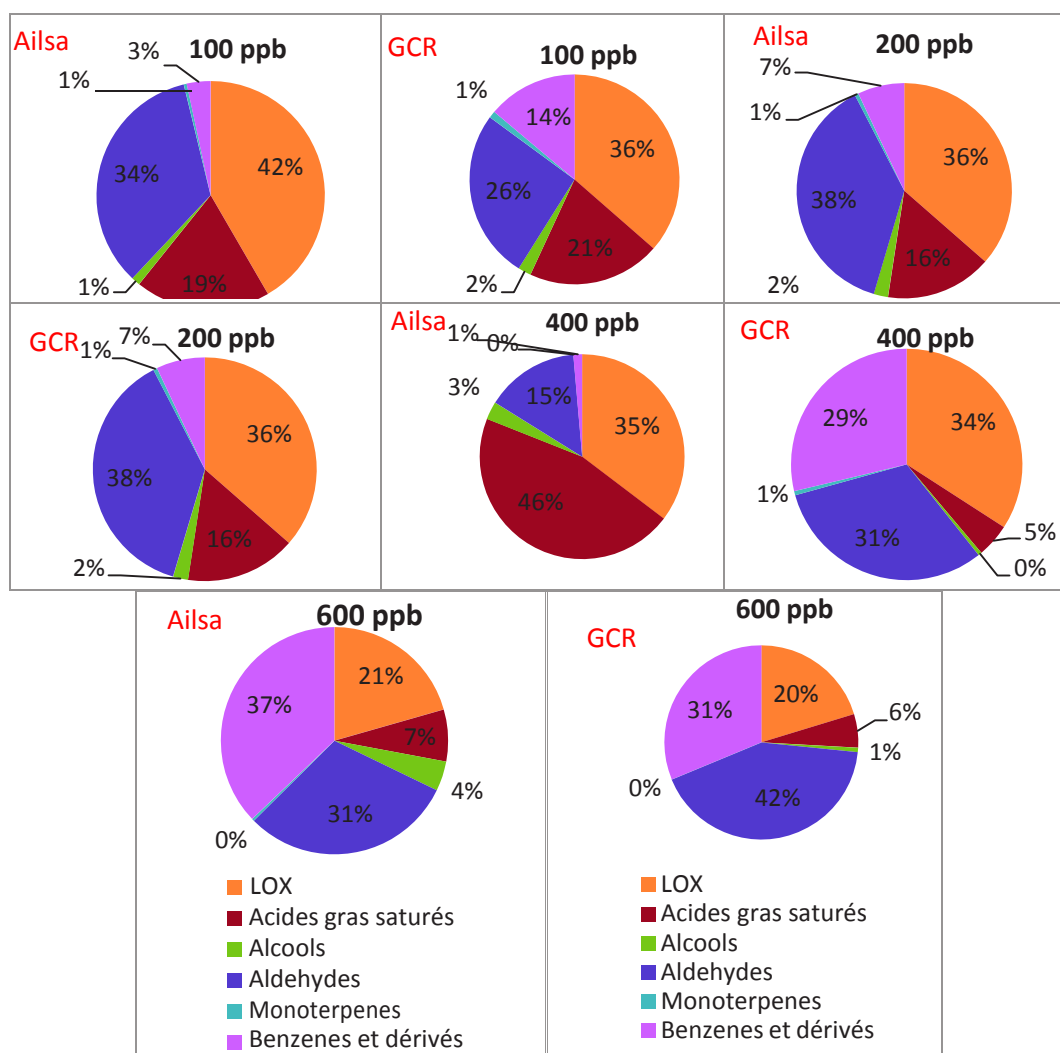


Figure 18. Pourcentage des émissions des différentes classes de COV émis au cours de l'exposition de Ailsa craig et GCR337 à l'O₃ : LOX, acides gras saturés, alcools, aldéhydes, monoterpènes et benzènes et dérivés chez Ailsa craig et GCR337. Ailsa: Ailsa craig, GCR : GCR337.

Cette comparaison entre le parent sauvage Ailsa craig et son mutant moins poilu GCR337 (faible densité de trichomes glandulaires et émissions de COV constitutifs réduites par rapport à son parent) avait pour objectif d'examiner le rôle de la densité des trichomes glandulaires dans la réponse des plantes au stress oxydatif. Seul le dépôt chimique a varié significativement entre les deux génotypes. On peut supposer que le dépôt d'O₃ inférieur chez le mutant est dû à la densité réduite, la morphologie et la taille tordue de ses trichomes glandulaires à la surface des feuilles. Une diminution significative de la photosynthèse et de la conductance stomatique a été détectée chez le mutant suite à la fumigation des plantes avec 200 et 400 ppb d'O₃, ce qui laisse supposer que le mutant ferme vite ses stomates. Les

CHAPITRE III

émissions des COV LOX étaient marginalement supérieures chez GCR337 à 400 et 600 ppb d'O₃. De plus les COV dérivés des benzènes étaient également significativement plus élevés chez le mutant GCR337 à 200 et 400 ppb d'O₃. On suppose que la densité réduite de trichomes glandulaires conduit à la sensibilité de mutant à l'O₃.

2.2.3. Comparaison entre Maofen B02 et son mutant Maofen B02* poilu

Cette comparaison entre le parent sauvage Maofen B02 et son mutant Maofen B02* avait pour objectif d'examiner également le rôle de la densité des trichomes dans la résistance ou la sensibilité des plantes de tomate. Le mutant analysé dans cette étude présentait une densité élevée des trichomes non glandulaires (contrairement à la comparaison entre Ailsa craig et son mutant non poilu GCR337, où on a comparé un mutant avec une densité faible des trichomes glandulaires). Les deux génotypes étaient presque exposés aux mêmes concentrations d'O₃ au cours des 4 étapes de fumigation (tableau 4). Les plantes exposées à l'O₃ avaient en moyenne $0.03 \pm 0.007 \text{ m}^2$ de surface pour le parent sauvage et $0.03 \pm 0.009 \text{ m}^2$ pour son mutant Maofen B02* ($P=0.96$), ($n=5-6 \pm \text{SEM}$), test de student.

2.2.3.1. Différents dépôts d'O₃

Le $\Phi\text{O}_3\text{P}$ qui inclut les dépôts surfacique, stomatique et chimique, était presque similaire chez le parent et son mutant et augmentait avec l'augmentation des [O₃]. Au contraire, le $\Phi\text{O}_{3\text{chim}}$ était significativement plus élevé chez le parent que chez le mutant ($P=0.004$, 0.04 et 0.03 à 100, 200 et 400 ppb respectivement).

$\Phi\text{O}_3\text{S}_{\text{tot}}$ était comparable entre les deux génotypes malgré la différence de $\Phi\text{O}_{3\text{chim}}$ entre les deux génotypes. Cela est dû à son taux faible par rapport au $\Phi\text{O}_3 \text{ P}$. Le $\Phi\text{O}_3 \text{ gs}$ était légèrement supérieur chez le mutant par rapport son parent sauvage et a différé marginalement lors de la fumigation des plantes à 100 et 600 ppb ($P=0.1$ et 0.05 respectivement) (figure 19).

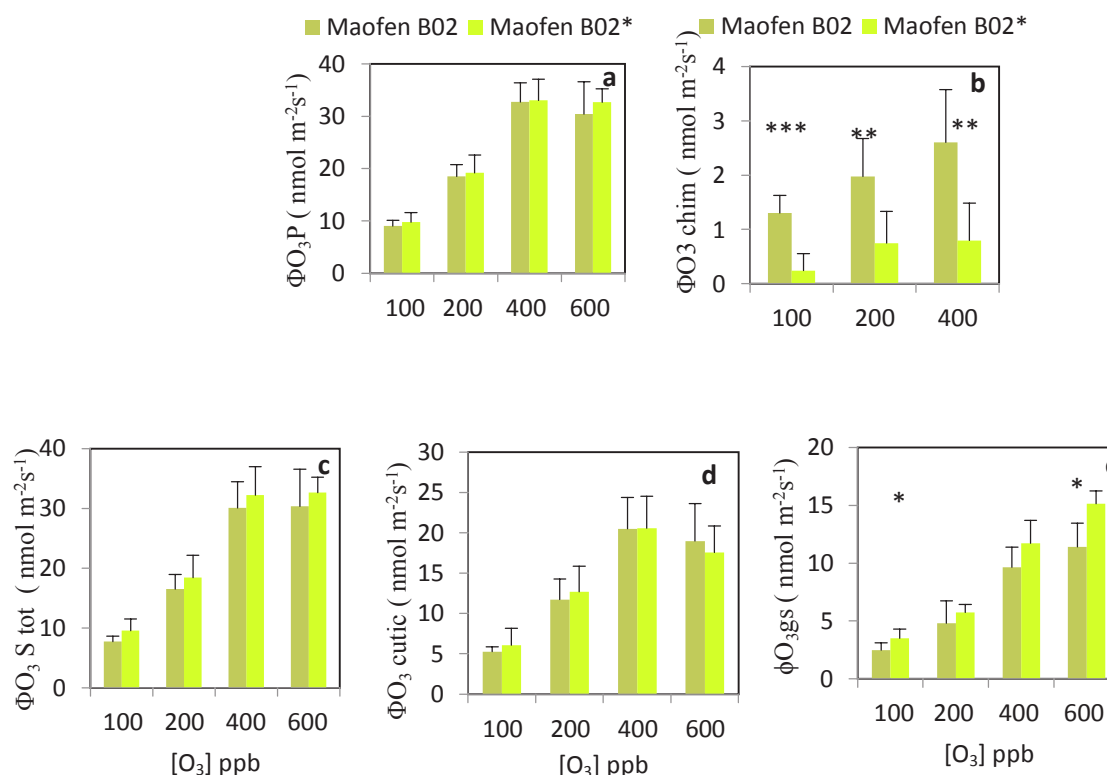


Figure 19. Changement des dépôts d'O₃ chez Maofen B02 et son mutant Maofen B02* en réponse à une augmentation graduelle d'exposition à l'O₃. Les graphes a et b montrent le dépôt d'O₃ total plante : $\Phi O_3 P$ et le dépôt d'O₃ chimique : ΦO_{3chim} mesuré dans les chambres « plante » et « réaction » respectivement. Les graphes c, d et e montrent les dépôts calculés, soit le dépôt d'O₃ surfacique totale : $\Phi O_3 S_{tot}$, le dépôt d'O₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} et le dépôt d'O₃ stomatique : $\Phi O_3 gs$ (n=5-6±SEM), * : $P \leq 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$, test de student.

2.2.3.2. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire, dépôt d'O₃ stomatique et dépôt d'O₃ chimique

Le ΦO_{3chim} représentait à 100 ppb 14% de dépôt total chez le parent et 2% chez son mutant ($P=0.002$) et cette contribution a diminué avec l'augmentation de [O₃]. A 600 ppb, le pourcentage de ΦO_{3cutic} était supérieur chez le parent ($P=0.07$), tandis que le pourcentage de $\Phi O_3 gs$ était légèrement plus élevé chez le mutant ($P=0.07$), malgré la densité importante des trichomes sur l'ensemble de son feuillage (figure 20).

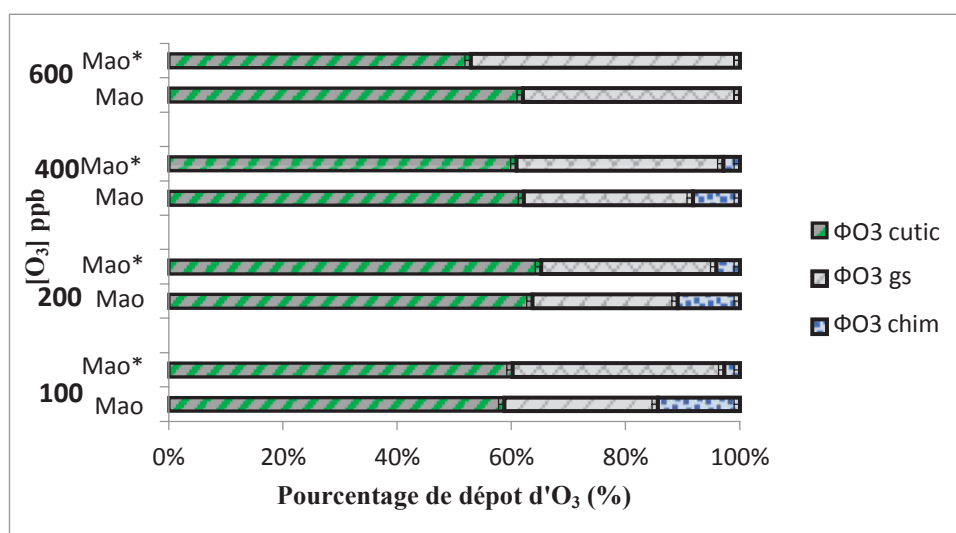


Figure 20. Pourcentage de dépôt d'O₃ cuticulaire : ΦO_{3cutic} , dépôt d'O₃ stomatique : ΦO_{3gs} et dépôt d'O₃ chimique : ΦO_{3chim} chez Maofen B02 et Maofen B02*. Mao et Mao* représente le parent Maofen B02 et son mutant MaofenB02* respectivement (n=5-6± SEM).

2.2.3.3. Photosynthèse (A), conductance stomatique (gs)

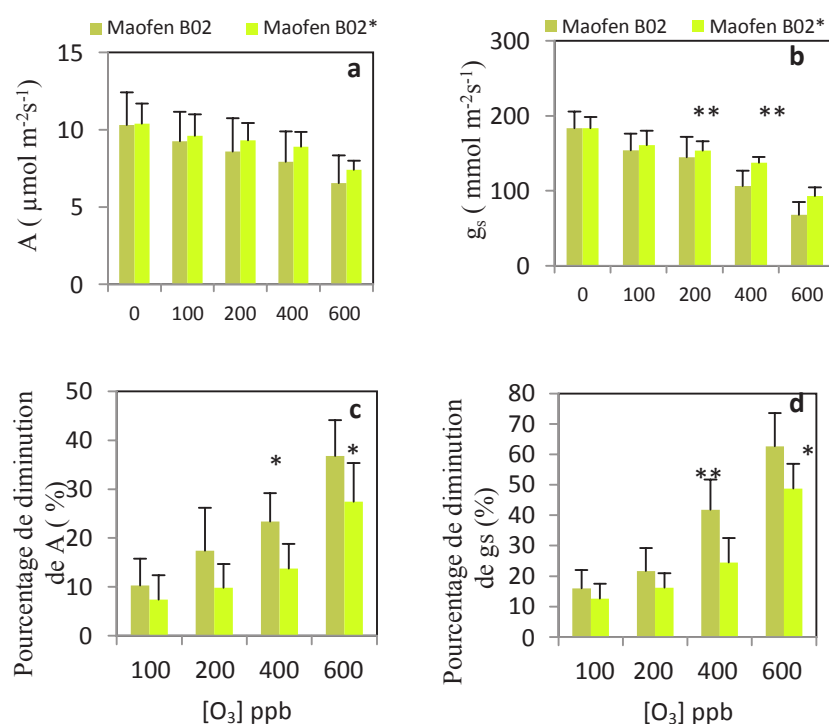


Figure 21. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d'O₃ chez Maofen B02 et Maofen B02* en valeurs absolues (a, b) et en valeurs relatives (c, d) exprimé en pourcentage par rapport aux conditions contrôles [O₃] = 0 ppb (n=5-6± SEM). Test de student : * : P ≤ 0.1, ** : P ≤ 0.05,

CHAPITRE III

*** : $P \leq 0.01$. Le rapport LMA était en moyenne de 27.73 ± 5.68 et 34.70 ± 3.49 g m² chez maofen B02 et son mutant respectivement ($P=0.11$), cependant étant donné que le mutant est caractérisé par une longue tige et rachis par rapport à son parent, le rapport LMA des feuilles seulement (sans tige et rachis), il était de moyenne de 21.38 ± 3.22 et 26.17 ± 3.17 g m² chez mafen B02 et son mutant respectivement ($P=0.08$) test de student.

Le pourcentage de diminution de gs en réponse à l'augmentation des [O₃] était supérieur chez le parent et une différence marginalement significative entre les deux génotypes a été observée à 400 et 600 ppb ($P=0.07$ et 0.05) respectivement. De la même manière, le pourcentage de diminution de A était supérieur chez le parent, une différence entre les deux génotypes était marginalement significative à 400 et 600 ppb ($P=0.08$ et 0.09) respectivement (figure 21).

2.2.3.4. Emissions des COV après l'exposition des plantes à l'O₃

Les émissions des COV terpéniques : α -pinène, β -phellandrène, β -caryophyllène ont été détectées avant l'exposition des plantes à l'O₃, puis ces COV ont disparu suite à l'exposition des plantes à l'O₃ sauf α -pinène. Ce dernier était significativement différent entre les deux génotypes lors de l'exposition à 200 ppb (annexe 3, tableau 4). Le mélange d'émissions comprenait des COV LOX dont 2,3, butanediol, hexanal, 3,4, hexanedione, l'acide valérique et l'acide hexanoïques, des COV aldéhydes dont heptanal, octanal, undecanal, dodecanal, 2 alcools : 2-éthylhexanol, dodecanol, les dérivés de benzènes : l'acétophénone et l'acide benzoïque. Et des acides gras, l'acide hexadecanoïque, l'acide decanoïque et l'acide nonaoïque.

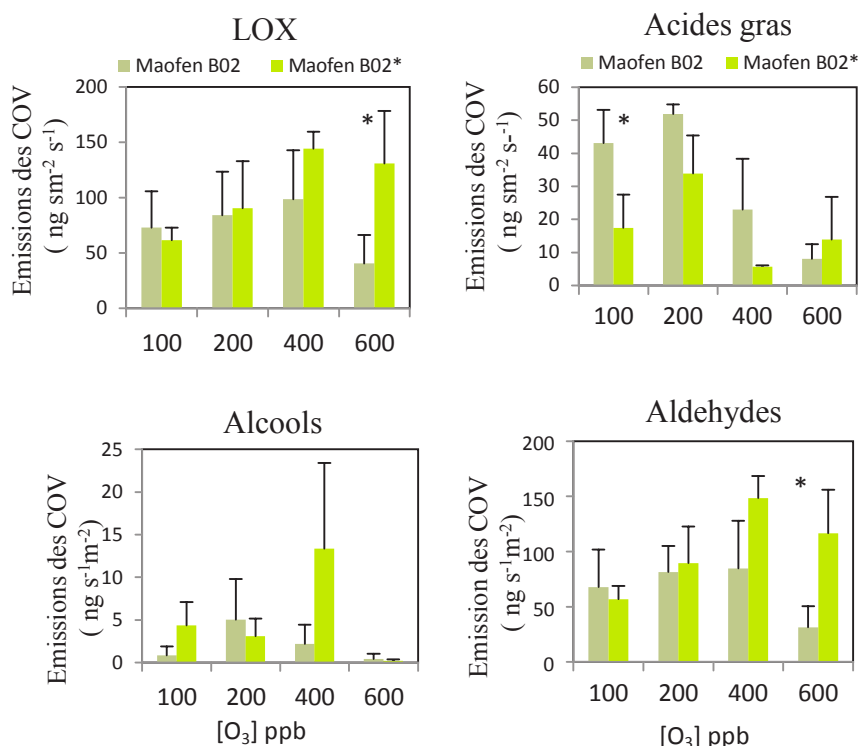


Figure 22. Emissions des COV des deux génotypes Maofen B02 et son mutant Maofen B02* $\text{ng m}^{-2}\text{s}^{-1}$ surface de la plante projetée ($n=3\pm\text{SEM}$) à chaque niveau de concentration d'O₃ appliqué. Test de student. * : $P < 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$.

A 100 et 200 ppb d'O₃ les émissions des LOX étaient quasi identiques chez les deux génotypes. Cependant à la fin de l'expérimentation, ces émissions ont diminué à 40.33 ± 25.88 chez le parent alors qu'elles ont continué à augmenter chez son mutant jusqu'à 130.99 ± 47.25 $\text{ng s}^{-1}\text{m}^{-2}$, cette différence étant marginalement significative ($P=0.09$). La somme des 3 acides gras saturés était supérieure chez le parent de 100 à 400 ppb d'O₃ (différence marginale à 100 ppb). Les émissions des COV aldéhydes ont suivi également les mêmes fluctuations que les LOX et étaient marginalement différentes entre les deux génotypes lors de leur exposition à 600 ppb ($P=0.08$) (figure 22).

CHAPITRE III

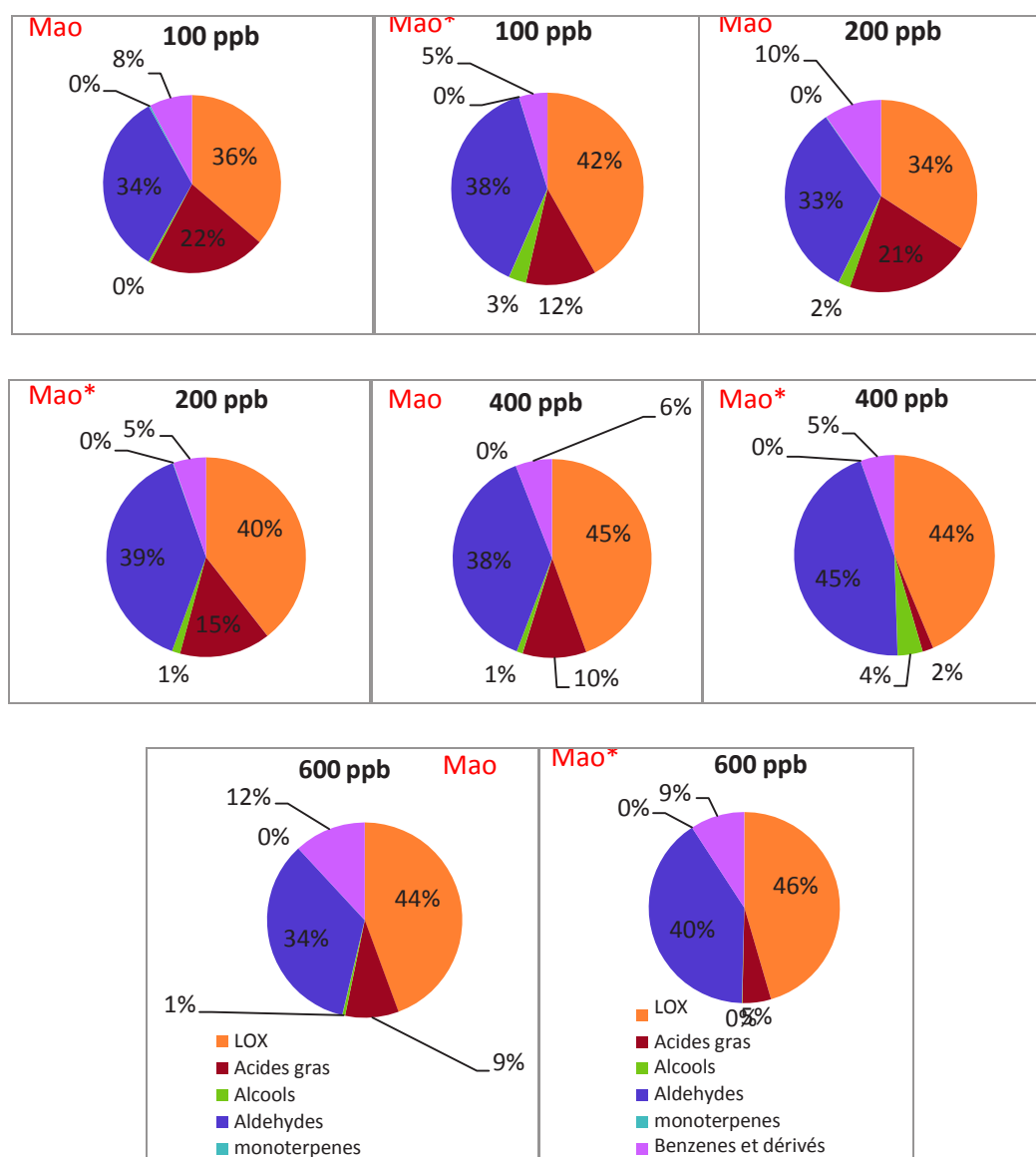


Figure 23. Pourcentage des émissions des différentes classes des COV émis au cours de l'exposition de Maofen B02 et Maofen B02* à l'O₃ : LOX, acides gras saturés, alcools, aldéhydes, monoterpènes et dérivés des benzènes. Mao: Maofen B02, Mao*: son mutant Maofen B02*.

Les LOX et des aldéhydes représentaient le plus fort pourcentage des émissions de COV, suivis par les composés acides gras lors de la fumigation des plantes à 100, 200 et 400 ppb d'O₃ et par les dérivées de l'oxydation de benzène suite à la fumigation des deux plantes à 600 ppb d'O₃. Les deux alcools représentaient un pourcentage très faible (figure 23).

Cette comparaison entre le parent sauvage Maofen B02 et son mutant Maofen B02* avait pour objectif d'examiner le rôle de la densité des trichomes non glandulaires dans la réponse des plantes à l'O₃. L'analyse de ΦO₃P était quasi identique chez les deux génotypes. Ce

CHAPITRE III

résultat est un peu inattendu, puisque on s'attendait à un dépôt d'O₃ supérieur chez le mutant qui présente une densité très élevée de trichomes sur l'ensemble de son feuillage et tige. Cela reflète probablement le fait que les trichomes non glandulaires ne possèdent pas de structures sécrétoires. De plus ces trichomes sont couverts d'une couche de cire constituée d'hydrocarbures saturés oxygénés et non oxygénés à longue chaîne (Corsi et Bottega, 1999) qui ont une très faible réactivité avec l'O₃. Nous supposons que l'aspect physique spécifique de ces trichomes ralentit et empêche le dépôt d'O₃ sur les feuilles. En outre le dépôt d'O₃ est exprimé par surface de plante projetée et il est donc sous-estimé puisque la densité des trichomes et la pilosité ne sont pas prises en compte. Le ΦO_3 chim était quant à lui supérieur chez le parent Maofen B02, ce qui est cohérent avec les émissions de COV constitutifs plus élevées chez le parent que chez le mutant.

2.3. Teneurs en chlorophylle, pourcentage de diminution de Fv/Fm et pourcentage de surface endommagée chez les parents et leurs mutants

Avant l'exposition des plantes à l'O₃, les teneurs en chlorophylle (estimées par SPAD) étaient de 34.10 ± 1.26 et 43.82 ± 0.81 chez Castelmart et Odorless respectivement ($P < 0.0001$), 32.16 ± 2.33 et 28.01 ± 1.09 chez Ailsa et son mutant GCR337 ($P = 0.01$) et 26.45 ± 1.05 et 24.33 ± 0.44 unité de SPAD chez Maofen parent et son mutant ($P = 0.05$). Le pourcentage de diminution de chlorophylle après l'exposition à l'O₃ était similaire entre les parents et leurs mutants (figure 24).

Fv/Fm était en moyenne de $14.90 \pm 5.16\%$ chez Castelmart et de $6.60 \pm 2.81\%$ chez Odorless, ($P = 0.03$), $8.08 \pm 3.9\%$ chez Ailsa Craig et $16.75 \pm 7.61\%$ chez GCR337 ($P = 0.04$), $17.22 \pm 4.01\%$ chez Maofen B02 et $11.96 \pm 3.92\%$ chez son mutant ($P = 0.14$). Le pourcentage de la surface endommagée atteignait $29.28 \pm 6.22\%$ et $6.48 \pm 1.48\%$ chez Castelmart et Odorless ($P = 0.0004$), $20.4 \pm 3.63\%$ et $35.47 \pm 4.79\%$ chez Ailsa craig et son mutant GCR337 ($P = 0.001$), et $19.3 \pm 4.52\%$ et $12.96 \pm 4.53\%$ chez Maofen B02 et son mutant ($P = 0.09$) (figure 24).

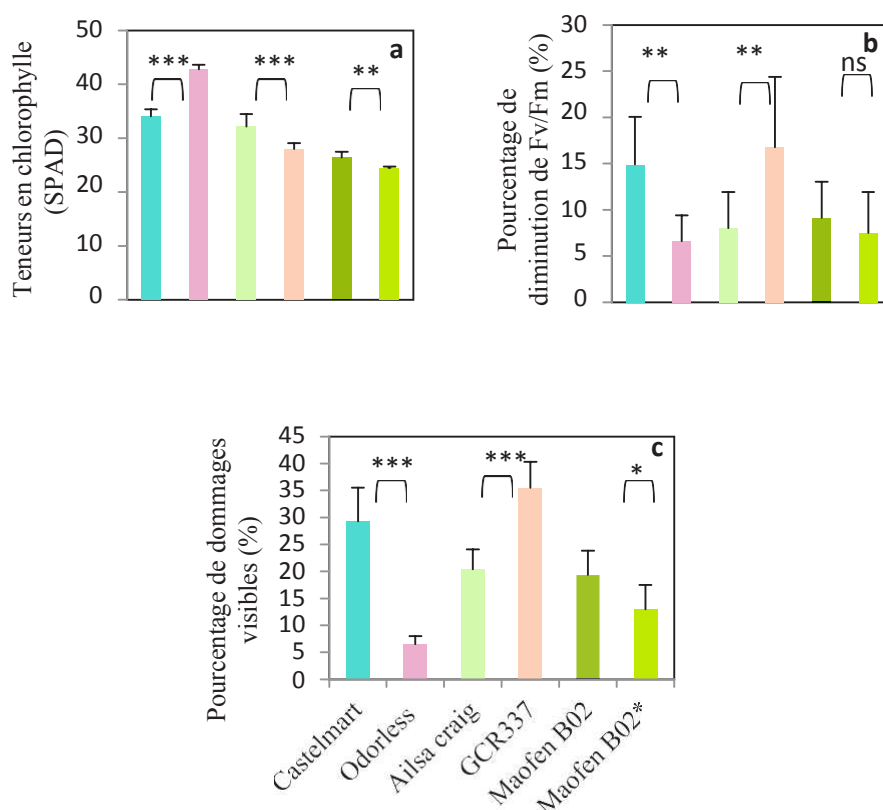


Figure 24. Mesures SPAD (a), pourcentage de diminution de Fv/Fm (b) et pourcentage de dommages visibles (c) chez les parents et leurs mutants : * : $P \leq 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$. Test de student.

2.4. Teneur des COV après l'exposition des plantes au stress oxydatif chez les parents et leurs mutants

L'analyse des extraits des feuilles de Castelmart fumigées avec l' O_3 a montré la présence des monoterpènes : α -pinène, δ -2-carène, β -phellandrène, et les sesquiterpènes : β -caryophyllène, δ -élémente et α -humulène. Cependant, une absence totale de ces COV a été observée chez Odorless (figure 25) comme observé avant l'exposition des plantes au stress. Un diterpène 'z phytol' a été détecté dans les extraits du mutant Odorless, qui n'était pas observé chez Castelmart. La somme des trois monoterpènes : α -pinène, δ -2-carène et β -phellandrène était de 14.41 ± 3.50 et $1.75 \pm 2.02 \mu\text{g g}^{-1}$ chez le parent Ailsa craig et son mutant respectivement ($P=0.01$). La somme des sesquiterpènes qui comprennent β -caryophyllène, δ -elemène et α -humulène était de 11.07 ± 5.95 et $5.13 \pm 2.22 \mu\text{g g}^{-1}$ chez le parent et son mutant respectivement ($P=0.29$) (voir tableau 5). La somme des émissions des monoterpènes (α -pinène, δ -2 -carène et β -phellandrène) était de 41.30 ± 23.06 et 9.59 ± 10.52 ($P=0.17$) et de sesquiterpènes (β -caryophyllène, δ -elemène, α -humulène) était de 63.33 ± 21.59 et $5.53 \pm 2.98 \mu\text{g g}^{-1}$ poids frais

CHAPITRE III

des feuilles chez le parent Maofen B02 et son mutant respectivement ($P=0.03$). En plus de ces terpenoïdes, d'autres composés qui n'ont pas été observés dans les extraits des feuilles des plantes saines (chapitre 2), ont été détectés dans les feuilles traitées avec l' O_3 . Ce sont les alcènes : tétradécène, hexadécène, octadécène, l'acide hexadecanoïque et l'acide α -linolénique dont la somme était élevée chez les mutants en générale, avec une différence significative entre Ailsa craig et son mutant ($P=0.04$) (tableau 5).

CHAPITRE III

Tableau 5. Teneur des COV après l'exposition des parents sauvages et leurs mutants au stress oxydatif $\mu\text{g g}^{-1}$ poids frais des feuilles ($n=3\pm\text{SEM}$), test de student. Valeurs en gras représentent les différences significatives ou marginalement significatives ($P \leq 0.1$). MNT : monoterpènes, SQT : sesquiterpènes, DTP : diterpène.

	Composés	Castelmart	Odorless	P	Ailsa Craig	GCR337	P	Maofen B02	Maofen B02*	P
MNT	α -pinène	29.02 $\pm$ 15.14	0		6.47 $\pm$ 1.26	0.79 $\pm$ 1.06	0.01	15.01 $\pm$ 10.01	4.29 $\pm$ 5.00	0.28
	δ -2 -carène	3.51 $\pm$ 1.23	0		1.55 $\pm$ 1.03	0	0	11.05 $\pm$ 3.84	0	
	β -phellandrène	29.02 $\pm$ 15.14	0		6.38 $\pm$ 1.20	0.95 $\pm$ 0.90	0.01	15.23 $\pm$ 9.20	5.66 $\pm$ 4.88	0.29
SQT	β -caryophyllène	17.05 $\pm$ 0.75	0		4.59 $\pm$ 3.42	0.47 $\pm$ 0.49	0.21	36.24 $\pm$ 14.65	2.94 $\pm$ 1.26	0.04
	δ -elemène	10.55 $\pm$ 2.64	0		5.28 $\pm$ 3.52	3.49 $\pm$ 0.81	0.58	17.70 $\pm$ 7.56	0	
	α -humulène	3.50 $\pm$ 1.93	0		1.19 $\pm$ 0.82	0.90 $\pm$ 0.90	0.79	9.38 $\pm$ 3.03	2.59 $\pm$ 1.72	0.07
DTP	z phytol	0	13.17 $\pm$ 8.78							
Autres	tetradécène	46.84 $\pm$ 1.76	3.08 $\pm$ 0.77	< 0.0001	1.88 $\pm$ 2.00	11.91 $\pm$ 3.64	0.05	17.60 $\pm$ 8.20	8.65 $\pm$ 5.76	0.3
	hexadécène	29.88 $\pm$ 15.71	15.71 $\pm$ 5.37	0.18	2.75 $\pm$ 3.00	20.91 $\pm$ 1.10	0	7.13 $\pm$ 2.21	28.97 $\pm$ 19.31	0.23
	octadécène	5.66 $\pm$ 6.00	10.33 $\pm$ 6.40	0.52	1.22 $\pm$ 1.60	9.71 $\pm$ 2.55	0.02			
	acide hexadecanoïque	0.84 $\pm$ 1.12	13.17 $\pm$ 4.64	0.02	1.08 $\pm$ 1.00	17.44 $\pm$ 7.54	0.06	19.5 $\pm$ 10.36	8.65 $\pm$ 11.00	0.41
	acide α -linoléinique	0	54.14 $\pm$ 30.45	0.07	0.83 $\pm$ 1.00	65.19 $\pm$ 48.94	0.16	2.98 $\pm$ 3,00	39.38 $\pm$ 26,25	0.16
Sommes	Monterpènes	61.57 $\pm$ 31.51	0		14.41 $\pm$ 3.50	1.75 $\pm$ 2.02	0.01	41.30 $\pm$ 23.06	9.59 $\pm$ 10.52	0.17
	Sesquiterpènes	31.11 $\pm$ 10.36	0		11.07 $\pm$ 5.95	5.13 $\pm$ 2.22	0.29	63.33 $\pm$ 21.59	5.53 $\pm$ 2.98	0.03
	Autres	83.23 $\pm$ 16.21	109.63 $\pm$ 50.74	0.55	7.79 $\pm$ 10	125.18 $\pm$ 59.45	0.04	47.19 $\pm$ 14.61	85.67 $\pm$ 57.11	0.44

CHAPITRE III

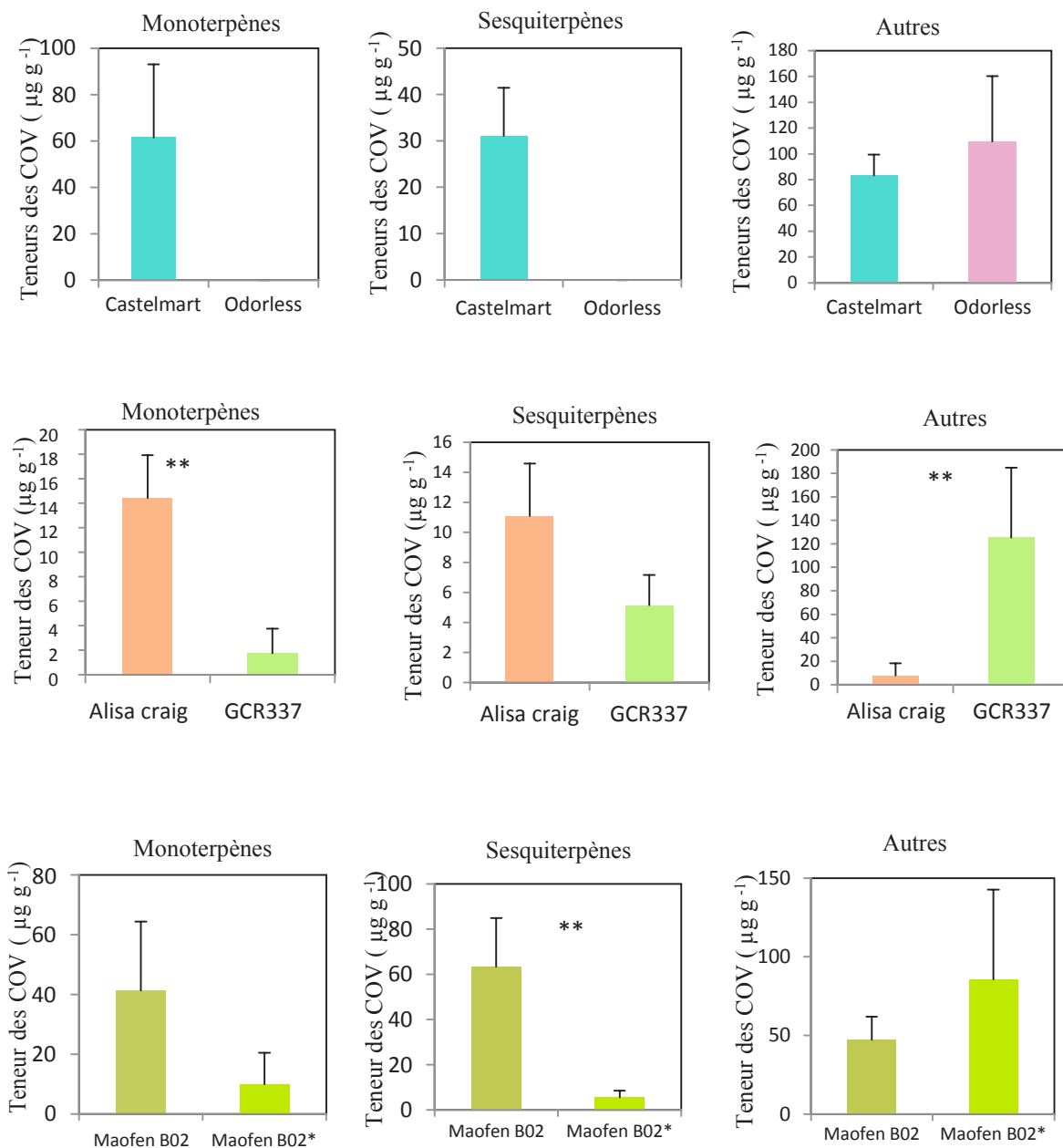


Figure 25. Teneur des COV stockés dans les feuilles des couples parents/mutants ($n=3 \pm$ SEM). Test de student. * : $P < 0.1$, ** : $P \leq 0.05$, *** : $P \leq 0.01$.

3. Discussion

1. Dépôt d'O₃ et rôle des COV, trichomes glandulaires et non glandulaires dans la résistance des plantes au stress oxydatif

Nous avons mené cette étude en laboratoire où nous avons appliqué un stress d'O₃ sur des parents sauvages et mutants de tomate. Le but était de comprendre comment les différences d'émissions, de teneurs en COV et de densité et de morphologie des trichomes influencent le dépôt d'O₃ et la résistance ou la sensibilité des plantes au stress oxydatif. Nous avons mesuré les changements d'assimilation nette et de conductance stomatique en tant que paramètres de performance des plantes entières. Nous avons également quantifié les lésions foliaires visibles, les émissions de COV induites par l'O₃ et analysé les teneurs des COV stockés dans les feuilles exposées à l'O₃.

Globalement, les dépôts d'O₃ cuticulaire et stomatique représentaient les deux principaux dépôts d'O₃, tandis que le dépôt d'O₃ chimique représentait le dépôt le plus faible. Ce dernier n'a pas dépassé 20% à des faibles concentrations d'O₃ et était autour de 5 % à des fortes concentrations d'O₃. La perte d'O₃ due aux réactions en phase gazeuse était également faible dans l'étude de Behnke *et al.* (2009) sur le peuplier émetteur d'isoprène, et représentait environ 3 % de dépôt d'O₃ total.

Nos résultats de comparaison entre deux parents MAGIC TOM, Cervil et LA0147, (qui se distinguent par la quantité des émissions de COV constitutifs), ont révélé un $\Phi_{O_3 P}$ élevé chez La0147 (le génotype qui émet et stocke une quantité supérieure de COV par rapport à Cervil). Les dommages visibles étaient comparables entre les deux génotypes mais le pourcentage de diminution de la photosynthèse et de la conductance stomatique était supérieur chez Cervil par rapport à LA0147. Néanmoins, le dépôt d'O₃ chimique était très faible (identique entre les deux génotypes) par rapport au dépôt d'O₃ cuticulaire et stomatique, en raison probablement des faibles émissions de COV. Toutefois, on suppose que la capacité de destruction d'O₃ s'est déterminée sur les surfaces des feuilles, là où la concentration des COV dans les tissus pourrait jouer un rôle dans la destruction l'O₃.

Il a été proposé que les émissions de COV et la capacité de défense antioxydante des feuilles peuvent jouer un rôle dans la destruction d'O₃, comme l'ont montré les études sur les espèces cultivées (Betzberger *et al.*, 2010, Feng et Kobayashi, 2016, Li *et al.*, 2018) et comme le suggèrent nos résultats de comparaison de deux génotypes avec des émissions de COV constitutifs contrastées. Cependant, les résultats de la deuxième comparaison entre Castelmart

CHAPITRE III

et Odorless qui avait pour but d'analyser le rôle du dépôt d'O₃ chimique dans la destruction d'O₃ et la résistance des plantes au stress ont montré des dépôts d'O₃ plante et surfacique tendanciellement plus élevés chez Odorless. Malgré que la réaction des COV avec l'O₃ était significativement supérieur chez Castelmart, elle était très faible par rapport aux autres dépôts. Fares *et al.* (2008) ont également rapporté que la destruction de l'O₃ par des réactions en phase gazeuse avec l'isoprène était négligeable chez des plantes de peupliers émettrices d'isoprène. En outre, nos résultats révèlent une résistance plus élevée du mutant Odorless (ce mutant est dépourvu de nombreux mono et sesquiterpènes et contient des teneurs réduites d'acide ascorbique) par rapport à son parent. En effet la surface des feuilles endommagées et la diminution de FV/Fm étaient supérieures chez Castelmart, malgré que les plantes d'Odorless étaient exposées à des concentrations d'O₃ supérieures. Cependant, aucune différence significative du pourcentage de diminution de la conductance stomatique et de la photosynthèse n'a été trouvée entre les deux génotypes. Le mutant résistant à l'O₃ présentait des teneurs élevées en acides citrique et malique par rapport à son parent sauvage, bien que, ces métabolites ont été analysés sur des feuilles non fumigés par l'O₃. L'activité antioxydante pourrait changer après l'exposition des plantes à l'O₃. Pasqualini et coll. (2001, 2002) ont montré qu'un cultivar de tabac Bel W3 sensible à l'O₃ répond au stress oxydatif en augmentant le transport de l'acide ascorbique dans l'apoplaste. Le rôle protecteur de l'ascorbate dans la tolérance à l'O₃ est très clair selon de nombreuses études (résumées dans Conklin et Barth, 2004). Il peut éteindre directement O₃ et piéger les ROS. Cependant, il a été rapporté qu'il pourrait réduire les réactions enzymatiques du cycle ascorbate glutathion, maintenant l'état réduit de l' α -tocophérol (Behnke *et al.*, 2009). Behnke *et al.* (2009) ont rapporté que les peupliers non émetteurs d'isoprène étaient plus résistants que les peupliers émetteurs et ont supposé que cela est dû à des niveaux élevés d'ascorbate et d' α -tocophérol. Cependant, des études sur des espèces ligneuses n'ont montré aucune relation entre la variation interspécifique de la sensibilité à l'O₃ et les concentrations d'antioxydants dans les tissus foliaires (Li *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2012). On suppose que d'autres métabolites que les COV et que l'acide ascorbique ont participé à la résistance d'Odorless à l'O₃ comme les composés non volatiles diterpènes (Jud *et al.*, 2016). Cette hypothèse est renforcée par la présence d'un diterpène α -phytol dans les extraits de feuilles du mutant mais pas de Castelmart. Ce diterpène acyclique est un précurseur des vitamines E et K, trouvé chez les plantes à chlorophylle estérifiées. Jud *et al.* (2016) ont rapporté qu'un diterpène cis-abiénol (C₂₀H₃₄O), présent sur la surface de la feuille de *N. tabacum* agit comme un puits efficace pour l'O₃. Mais, bien entendu, les terpénoïdes, y compris les mono- et

CHAPITRE III

sesquiterpènes présents dans les émissions et les teneurs de Castelmart, peuvent contribuer à la détoxification de l'O₃. En outre, Peisker et coll. (1989) ont rapporté que la libération de phytol est l'événement initial de la dégradation de la chlorophylle. Ebukanson, (1989) a rapporté que l'augmentation du phytol dans les aiguilles de *Picea abies* peut être interprétée comme une dégradation de la chlorophylle induite par le traitement à l'O₃. Cependant, les mécanismes possibles de l'O₃ sur la libération du phytol et son rôle principal sont encore inconnus (Ekeberg *et al.*, 2015). Chez *Odorless*, ce sont principalement les trichomes peltale de type VI qui sont dépourvus de terpénoïdes, et leur densité est également affectée (Kang *et al.*, 2010). La densité des trichomes de type VI sur les feuilles de *Odorless* étaient de $621 \pm 187 \text{ cm}^2$, soit presque deux fois plus faible que celle du parent sauvage de $1112 \pm 180 \text{ cm}^2$ ($P=0,001$). Mais il n'a pas été montré que les trichomes capités type I étaient affectés. Nos observations microscopiques ont révélé que morphologiquement, les trichomes du mutant étaient différents de ceux du parent sauvage. En outre, Jud *et al.* (2016) ont rapporté qu'une variété de tabac manquant de trichomes peltés, avait un degré d'absorption non stomatique fortement corrélé à la densité des trichomes capités, ce qui montre que les trichomes capités contribuent également aux réactions de surface avec l'O₃. Par ailleurs, le dépôt d'O₃ est exprimé par surface de feuilles projetées, et donc la pilosité, la surface et la taille des trichomes n'ont pas été prises en compte. En outre, Kortbeek *et al.* (2016) avaient décrit que la surexpression de la farnésyl diphosphate synthase (FPS) responsable de la synthèse des sesquiterpènes dans les trichomes glandulaires de la tomate destinée à augmenter la production de sesquiterpènes a conduit à une perte de production de monoterpènes. Avec cet exemple, on peut extrapoler que la mutation pourrait affecter d'autres voies de biosynthèse non ciblées chez *Odorless*. La régulation à la baisse ou la répression de l'émission d'isoprène chez les émetteurs naturels peut provoquer une forte induction d'autres molécules antioxydantes (par exemple l'ascorbate et le tocophérol (Behnke *et al.*, 2009). C'est en fait une autre indication forte que des mécanismes compensatoires sont exploités pour remplacer l'action antioxydante des terpènes volatils.

D'autres traits adaptatifs comme le LMA qui était supérieur chez *Odorless* peuvent être impliqués. Les feuilles avec un LMA élevé ont souvent une couche de mésophylle palissadique épaisse et/ou dense (Li *et al.*, 2016), ce qui signifie que l'exposition à l'O₃ interne par unité de masse cellulaire du mésophylle sera plus faible. Enfin, il est possible que les feuilles avec un LMA élevé soient moins sensibles à l'O₃ du fait d'avoir une fraction foliaire apoplastique plus élevée que les feuilles à faible LMA, comme suggéré par (Niinemets, 1999, Feng *et al.*, 2018). Shang *et al.* (2017) rapportent que des feuilles avec un LMA faible ont

CHAPITRE III

tendance à avoir de plus grands espaces d'air internes propices à la diffusion, et une plus grande surface de la cellule est exposée à l'O₃ et aux ROS. Donc un stress oxydatif causé par une quantité donnée de flux d'O₃ stomatique par unité de surface foliaire serait réparti sur une masse foliaire plus importante, et donc dilué dans une feuille à forte LMA. Chez de nombreuses espèces ligneuses, la LMA a joué un rôle important dans l'acclimatation foliaire à des concentrations élevées d'ozone troposphérique (Pääkkönen *et al.*, 1997), et dans les processus de désintoxication (Lyons *et al.*, 2000). L'augmentation de la LMA des hêtres peut s'accompagner d'une production accrue de métabolites secondaires (Bussotti *et al.* 1998).

Nos résultats révèlent une relation négative entre le LMA et le pourcentage de surfaces endommagées par le stress oxydatif (figure 26).

La comparaison de Ailsa Craig et de son mutant non poilu GCR337 a permis d'analyser le rôle des trichomes glandulaires dans le dépôt d'O₃ et la résistance des plantes. GCR337 était plus sensible au stress oxydative, et présentait des dépôts d'O₃ chimique, plante, surfacique total, cuticulaire inférieurs à ceux de son parent. Comme déjà évoqué, le dépôt d'O₃ est exprimé par surface de la plante, il ne prend pas en compte la pilosité des surfaces foliaires et il est donc sous-estimé chez le mutant dû à la densité réduite de trichomes. On suppose que le dépôt d'O₃ inférieur chez le mutant est dû à la densité réduite, la morphologie et la déformation de ses trichomes glandulaires à la surface des feuilles. En outre, Kang *et al.* (2010) ont comparé des plantes de deux génotypes (Ailsa craig et un mutant très semblable au GCR337) avec un développement similaire et ont montré que les densités de trichomes de type I et VI sur le mutant étaient réduites de 57% et 70%, alors que les densités de trichomes non glandulaires (types III et V) étaient similaires à celles du sauvage. Nos résultats ont montré un dépôt d'O₃ surfacique légèrement élevé chez Ailsa craig par rapport à son mutant (mais différence non significative). Li *et al.* (2018) supposaient que le dépôt d'O₃ surfacique élevé était en relation avec la présence des trichomes glandulaires remplis de terpènes à la surface des feuilles. Ce mutant a également des émissions et des teneurs réduites de sesquiterpènes β - caryophyllène et copaène, connues pour leur réactivité avec l'O₃. Li *et al.* (2018) ont rapporté une corrélation négative entre la densité des trichomes glandulaires et les émissions des LOX. Nous n'avons pas mesuré la densité des trichomes glandulaires chez nos génotypes, mais des études antérieures ont rapporté une densité réduite de ces trichomes glandulaires de type I et VI chez le mutant qui a émis une quantité supérieure de LOX. A la lumière de nos résultats, nous supposons que la densité réduite de trichomes glandulaires est un trait de sensibilité du mutant à l'O₃ vu que sa capacité de destruction de l'O₃ était

CHAPITRE III

inférieure, et qu'il présentait un pourcentage élevé des dommages visibles. Cette hypothèse est soutenue par Kang *et al.* (2010) qui rapportent que la sensibilité d'un mutant non poilu aux attaques herbivores pourrait être attribuée à un défaut de résistance médiée par les trichomes et les émissions réduites de sesquiterpènes (Tian *et al.*, 2012, Kang *et al.*, 2016).

Dans le but d'examiner le rôle de la densité des trichomes non glandulaires dans le dépôt d'O₃ et la résistance des plantes, nous avons comparé un parent sauvage Maofen B02 et son mutant poilu ayant une densité élevée de trichomes non glandulaires. Les résultats ont révélé que ces derniers n'ont pas d'effet sur le ΦO_3P ou ΦO_{3cutic} . Cependant, ces résultats sont interprétés avec prudence puisque la surface des trichomes non glandulaires n'est pas prise en compte dans le calcul de dépôt d'O₃. Le dépôt d'O₃ cuticulaire quasi identique chez le mutant et le parent reflète l'inutilité des trichomes non glandulaires dans la destruction d'O₃. Les trichomes non glandulaires ne possèdent pas de mécanisme de sécrétion des COV et il n'existe pas d'études faisant référence à l'existence de concentrations élevées de terpénoïdes dans ces structures. Par contre, des études réalisées sur un certain nombre d'espèces d'arbres et d'arbustes comme l'olivier ont révélé l'accumulation de grandes quantités de composés phénoliques, principalement aux premiers stades de développement, sans pouvoir de sécrétion apparente (Karabourniotis *et al.*, 2020). Il a été rapporté que les composés phénoliques peuvent avoir des fonctions antioxydantes par piégeage des ROS (Grace, 2007, Tattini *et al.*, 2007) alors qu'aucun effet de ces COV possiblement sécrétés n'a été trouvé sur la destruction de l'O₃ en phase gazeuse. Ceci est probablement dû aux couches des cires qui recouvrent leur surface. Li *et al.*, 2018 ont rapporté que les trichomes non glandulaires n'affectent pas l'absorption d'O₃ par les feuilles, et indiqué qu'il n'y a pas de relation entre la densité des trichomes non glandulaires et la quantité d'absorption d'O₃ non stomatique chez les espèces présentant une quantité importante de trichomes non glandulaires. Leur rôle dans les réponses antioxydantes est moins clair. Ces rapports contradictoires pourraient être attribués aux différences physiologiques entre les espèces, en plus certains trichomes sont morts à maturité, et donc ils ne peuvent pas avoir un rôle protecteur (Karabourniotis *et al.*, 2020).

Nous avons remarqué que le dépôt d'O₃ stomatique était supérieur chez le mutant par rapport à son parent sauvage à 100 et 600 pbb. Ceci reflète que les trichomes non glandulaires n'ont pas freiné ou réduit l'entrée de l'O₃ par les stomates et n'ont pas protégé les plantes du dépôt d'O₃ stomatique. Il a été rapporté que les stomates exercent un contrôle important sur les concentrations d'O₃ à l'intérieur des feuilles et jouent ainsi un rôle majeur dans la protection

CHAPITRE III

des feuilles contre le stress O_3 (Beauchamp *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2017). Cependant, les résultats de notre étude montrent que malgré que le dépôt stomatique était légèrement supérieur chez le mutant Maofen poilu par rapport à son parent, le mutant présentait une surface endommagée plus faible et une moindre diminution de A et gs que son parent sauvage.

En résumé, nos résultats suggèrent que les trichomes glandulaires et les COV constitutifs pourraient protéger les plantes de tomate du stress oxydatif causé par l' O_3 (dans le cas de la comparaison entre Cervil et LA0147 et entre Ailsa craig et son mutant non poilu GCR337), à condition que la mutation n'affecte pas fortement les voies de biosynthèse des COV comme chez Odorless. On suppose dans ce cas que la forte réduction des terpènes a fait été compensée par la formation d'une autre classe de composés ou une activité enzymatique qui pourrait être plus efficaces dans la résistance des plantes à l' O_3 . En outre les trichomes non glandulaires ne participent pas au dépôt d' O_3 mais pourraient protéger la plante du stress oxydatif. Dans tous les cas, la destruction de l' O_3 par des réactions en phase gazeuse (dépôt chimique) était faible et même si elles différaient entre les émetteurs et les émetteurs réduits de COV constitutifs, elle n'a contribué qu'à un faible pourcentage du dépôt d' O_3 total. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour explorer d'autres classes de métabolites secondaires et pour comprendre comment divers types de trichomes glandulaires et non glandulaires contenant différents COV affectent la résistance des plantes à l' O_3 .

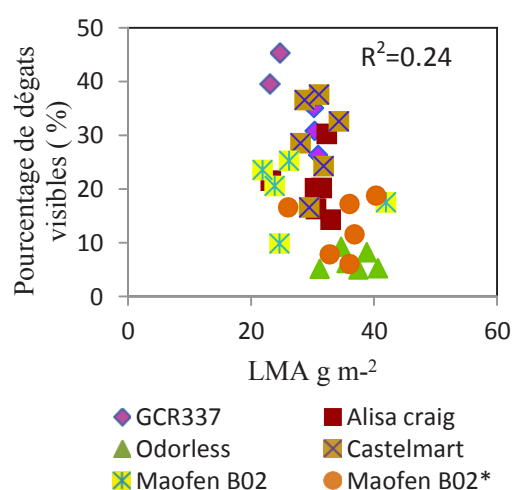


Figure 26. Relation entre le pourcentage de dommages visibles (%) et le LMA g m².

2. Emissions des COV suite à l'exposition des plantes à l'O₃

Nous nous concentrons sur les émissions des COV LOX et les produits formés après l'exposition des plantes à l'O₃, puisque les COV terpéniques pourraient être transformés en raison de la réaction en phase gazeuse des COV avec l'O₃. De plus leurs émissions étaient dans l'ensemble faibles.

Une forte augmentation du carbone émis sous forme de COV suite à l'exposition à l'O₃ a été observée. Ceci résulte de l'ozonolyse des composés à la surface des feuilles et / ou de l'émission induite d'espèces oxygénées par la plante elle-même. Cette émission était principalement composée des COV LOX et aldéhydes, acide carboxylique et acides gras, dérivés de benzènes et alcools. Behnke *et al.* (2009) ont rapporté que les émissions des LOX sont la réponse la plus rapide après exposition des plantes à l'O₃. Nos résultats ont révélé que les génotypes sensibles à l'O₃ qui présentaient des lésions physiques ont émis une quantité importante de LOX (les différences n'étaient parfois que marginalement significative entre les génotypes considérés résistants et sensibles). Ce n'était pas le cas du mutant poilu Maofen B02*, pour lequel on suggère que la densité élevée des trichomes le protégé des dommages et ni de Odorless qui n'a presque pas présenté de dommages physiques. Chez les autres quatre génotypes les émissions des LOX sont corrélées positivement au pourcentage de surface foliaire endommagée (figure 27). Ceci soutient l'idée que l'émission des LOX est un indicateur fiable du stress oxydatif (Beauchamp *et al.* 2005).

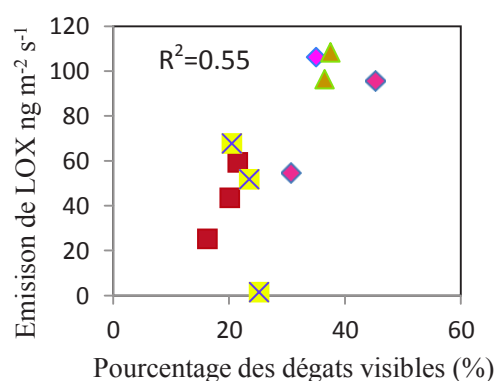


Figure 27. Relation entre le pourcentage des dégâts visibles et les émissions de LOX chez les génotypes analysés sauf Odorless et Maofen B02. Les triangles représentent Castelmart, les carrés rouges : Ailsa craig, croix jaunes : MaofenB02, losanges : GCR337.

CHAPITRE III

Les émissions de LOX sont composées des volatils classiques tels que le pentanal (C_5) et l'hexanal (C_6), ces deux COV sont des aldéhydes saturés. Compte tenu de leur masse moléculaire faible, ils pourraient refléter en partie l'activité de la voie LOX (Wildt *et al.*, 2003). La formation de l'hexanal est en partie attribuée à la dégradation des lipides membranaires par les enzymes lipoxygénase et hydroperoxyde lyase (Heiden *et al.*, 2003). Elle est associée à l'effet direct du clivage des acides gras par la lipoxygénase dans les membranes des feuilles exposées à l' O_3 (Paoletti, 2006). Lorsque l'acide linoléique est le composé de départ, il forme de l'hexanal. L'acide valérique ou pentanoïque est principalement produit par oxydation du pentanal en présence de dioxygène. 2,3-hexanedione est un α -diketone qui a été identifié comme produit de réaction dans l'ozonolyse des alcènes (Bouzidi *et al.*, 2014). L'émission de l'acide hexanoïque, aussi appelé acide caproïque, qui est un acide carboxylique était corrélée avec l'hexanal (figure 28).

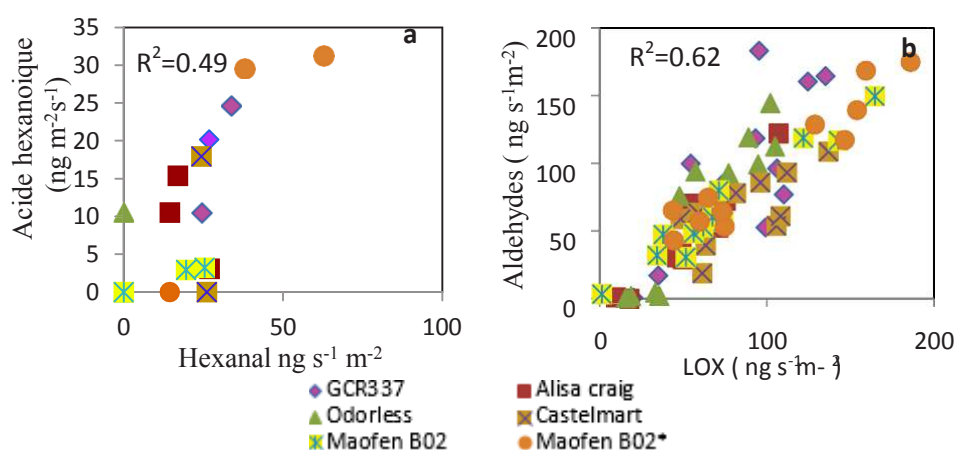


Figure 28. a : Relation entre les émissions d'hexanal et d'acide hexanoïque chez les 6 génotypes analysés (n=3). Les points représentent les émissions des deux COV lors de l'exposition des plantes à 600 ppb d' O_3 . b. Corrélation entre les émissions des LOX et les émissions des aldéhydes chez les 6 génotypes analysés (n=5-6). Les points représentent la somme des LOX et aldéhydes aux 4 concentrations d' O_3 .

L' O_3 produit une énergie ozonide primaire riche, qui se décompose pour créer un intermédiaire Criegee et du formaldéhyde. Ces intermédiaires peuvent subir des réactions unimoléculaires qui conduisent à une variété de produits, y compris des aldéhydes et des acides carboxyliques. Il a été proposé que les aldéhydes volatils sont plus probablement dérivés de la membrane plasmique (Carlsson *et al.*, 1994). Wild *et al.* (2003) ont également

CHAPITRE III

rapporté une émission de hexanal, heptanal et octanal chez le pin exposé à l'O₃ et supposé que les émissions d'aldéhydes sont une réponse générale des plantes à l'absorption d'O₃. Helmig *et al.* (1996) ont supposé que la formation des aldéhydes est peut-être due à la réaction des ROS avec des composés organiques. Les émissions des aldéhydes ont été également observées suite à l'exposition du blé, du tabac et de canola à l'O₃ et des plantes de tomate également après une exposition à 150 ppb pendant 24h. De même, une formation d'aldéhydes par des processus enzymatiques ne peut être exclue (Wild *et al.*, 2003). Ces auteurs rapportent que les émissions d'aldéhydes ne sont pas directement liées à l'activité des LOX, tandis que dans notre étude la quantité des émissions des LOX et les aldéhydes étaient quasi identiques et ils corrélés positivement entre eux (figure 28). En principe, trois mécanismes différents sont impliqués dans les émissions d'aldéhydes : i) des émissions issues de pools de stockage dont les trichomes, ii) des émissions parallèles à la biosynthèse de ces composés, iii) des émissions causées par les processus d'oxydation en phase gazeuse ou en phase liquide à l'intérieur de la plante.

L'action directe de l'O₃ sur les cellules végétales peut provoquer la stimulation de l'activité lipolytique. Dans les feuilles, les acides gras les plus abondants sont dans l'ordre : l'acide linoléique qui est l'acide gras principal qui compose les membranes des thylacoïdes des feuilles (Harwood, 1996). L'acide hexadécanoïque C₁₆ est le premier acide gras produit au cours de la lipogenèse, puis à partir de lui, les acides gras plus longs peuvent être produits. Ces acides ont été détectés dans le mélange des émissions et les teneurs des COV stockés par nos plantes. L'acide hexadécanoïque a été trouvé également dans les feuilles de vignes traitées par l'O₃ (Rebouças, 2015). L'acide nonanoïque est un acide carboxylique qui se produit principalement par l'hydroformylation, appelé aussi procédé oxo : voie de synthèse des aldéhydes à partir d'alcènes et par traitement de l'acide oléique avec de l'O₃ (Riemenschneider, 2000). L'émission de ces composés était légèrement corrélée avec le pourcentage de surfaces foliaires endommagées (figure 29).

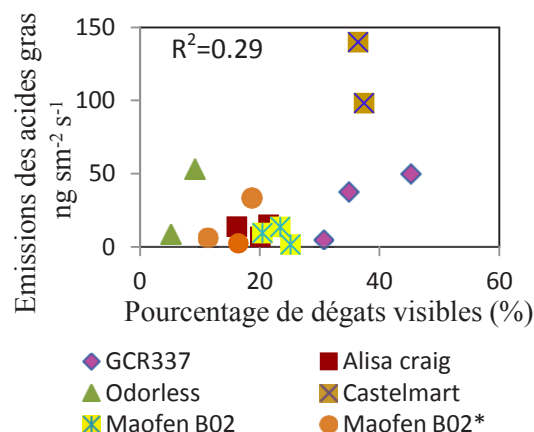


Figure 29. Relation entre le pourcentage des dommages visibles et les émissions des acides gras $\text{ng m}^{-2}\text{s}^{-1}$ surface de la plante ($n=3$), le coefficient de corrélation est $R^2=0.29$.

L'éthyl benzène, un composé organique aromatique dérivé du benzène a été détecté également. La réaction de l' O_3 avec l'éthylbenzène produit l'acétophénone comme intermédiaire, et une oxydation supplémentaire transforme l'acétophénone en acide benzoïque (Bushuev, 2015). L'analyse des teneurs de COV dans les extraits des feuilles a révélé en plus des acides gras des alcènes : octadécène, tétradécène et hexadécène ; la transformation de ce dernier en phase gazeuse produit les acides carboniques comme l'acide nonaoïque (Riemenschneider, 2000). Chez Odorless, les teneurs des acides gras étaient élevées, alors qu'ils étaient faiblement émis pendant la fumigation des plantes avec l' O_3 . Cela pourrait revenir à une formation tardive ou à leurs faibles volatilités.

3. Les réponses physiologiques des plantes à l' O_3

L'analyse des lésions est un critère physique visuel simple qui permet d'évaluer les dommages causés par l' O_3 . Les blessures visibles pourraient être causées par la perte de l'eau intracellulaire en raison d'une défaillance de la membrane cellulaire qui permet au matériel osmotique de s'écouler hors de la cellule (Orvar *et al.*, 1997). Nous avons remarqué que les lésions sur les feuilles étaient unifaciles, et qu'aucune tache ni dommage n'étaient visibles sur la partie tige. Au-delà des blessures visibles, la photosynthèse a été largement analysée chez les plantes en réponse à l' O_3 . En général, l'exposition à l' O_3 cause des pertes de la capacité photosynthétique dues principalement à la réduction de l'efficacité de la carboxylation liée à une diminution de l'activité de la Rubisco ou à une baisse de sa concentration dans les feuilles, entraînant une hausse de la concentration interne en CO_2 (C_i) et une fermeture stomatique (Bagard *et al.*, 2008). La chute de F_v / F_m peut-être un indicateur d'induction par

CHAPITRE III

l'O₃ de perturbations dans les centres de réaction du PSII. Une relation positive a été trouvée entre le pourcentage de diminution de Fv/Fm et le pourcentage de diminution de A ou le pourcentage de dommages visibles. En outre A et gs étaient également corrélés avec le dépôt d'O₃ sur la plante (figure 30).

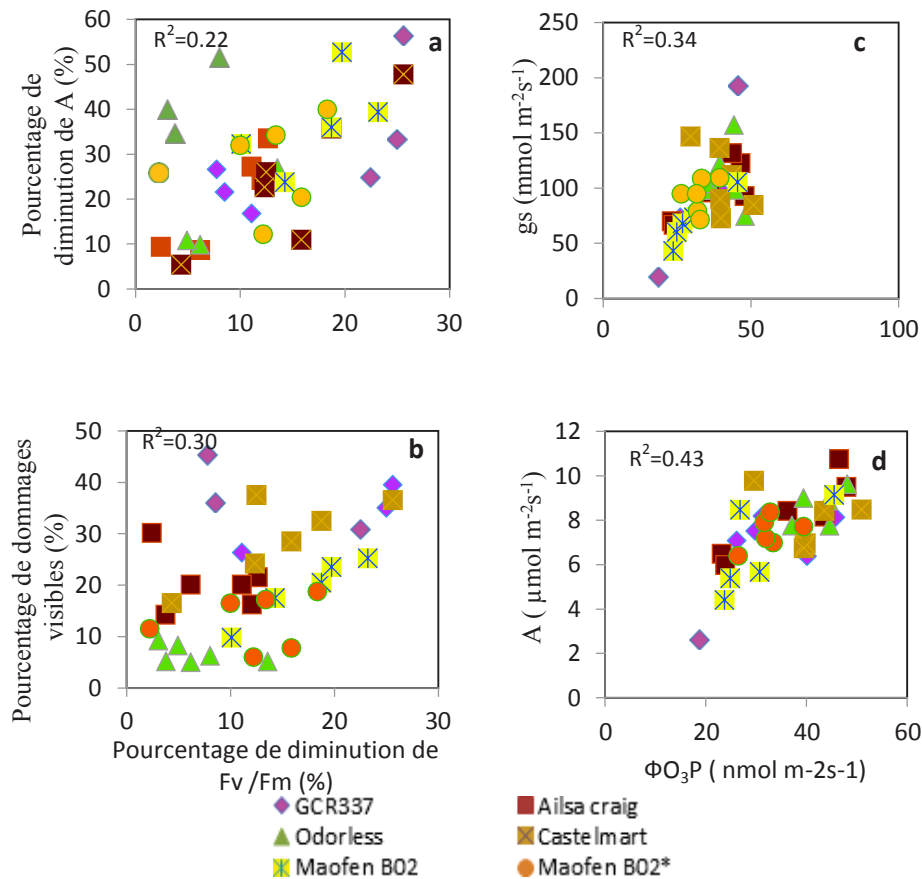


Figure 30. a et b : Relations entre le pourcentage de diminution de Fv/Fm : et pourcentage de diminution de A et dommages visibles. c et d : Relation entre le dépôt O₃ plante : ΦO_3P et la photosynthèse A et conductance stomatique gs (n=5-6).

4. Comparaison des dépôts d'O₃ entre les trois mutants

Dans cette partie on analyse les différences entre les trois mutants, afin de distinguer les traits qui participent à la résistance des plantes à l'O₃ (densité des trichomes glandulaires, réduite (GCR337) ou densité élevée des trichomes non glandulaires (Maofen B02*) ou absence de COV terpéniques (Odorless)).

CHAPITRE III

4.1. Différents dépôts d'O₃

La comparaison entre les trois mutants a révélé un Φ_{O_3P} , $\Phi_{O_3S_{tot}}$ et Φ_{O_3cutic} supérieur chez Odorless par rapport aux deux mutants GCR337 et Maofen B02. De plus, ces deux derniers présentent des types de trichomes différents, les trichomes glandulaires pourraient être des puits physico chimiques de l'O₃, tandis que les trichomes non glandulaires sont plutôt des puits physiques. Ce résultat pourrait suggérer qu'une densité importante de trichomes non glandulaires pourrait compenser l'absence de trichomes glandulaires à la surface des feuilles pour le dépôt d'O₃.

4.2. Photosynthèse (A), conductance stomatique (gs)

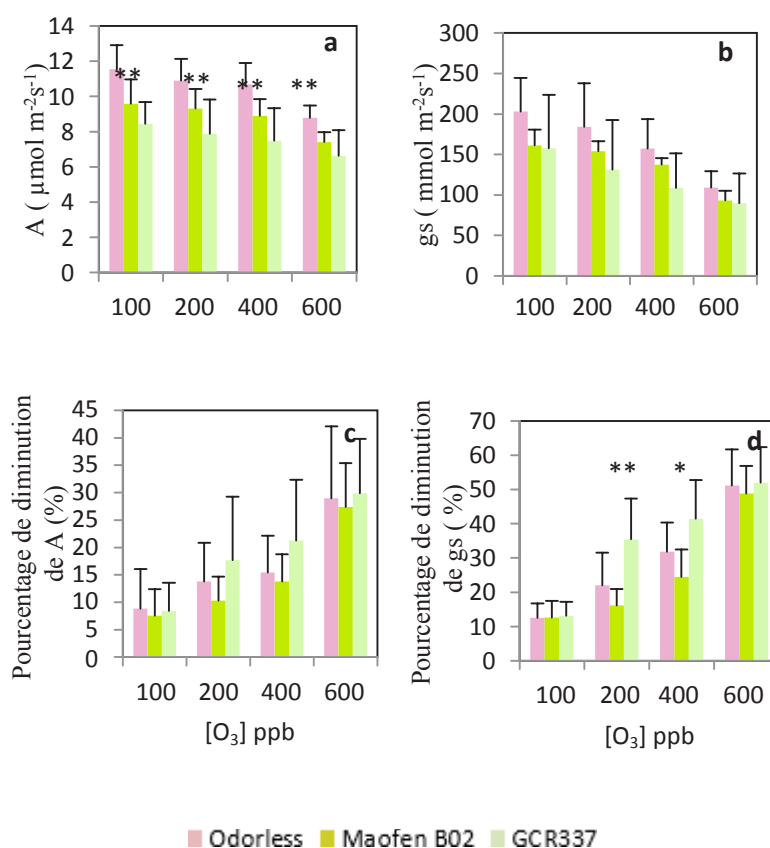


Figure 31. Changement de la conductance stomatique (gs) et de la photosynthèse (A) au cours de l'augmentation des concentrations d'O₃ chez les trois mutants en valeurs absolues (a, b) et en valeurs relatives (c, d) exprimé en pourcentage par rapport aux conditions contrôles [O₃] = 0 ppb (n=5-6 ± SEM). Anova. * : P ≤ 0.1, ** : P ≤ 0.05, *** : P ≤ 0.01.

CHAPITRE III

Lors de la fumigation des plantes avec l'O₃, A différait significativement entre les génotypes, mais la diminution de A était comparable pour tous les génotypes. Au contraire le pourcentage de diminution de gs était supérieur chez GCR337, suivi par Odorless par rapport à Maofen B02 (figure 31).

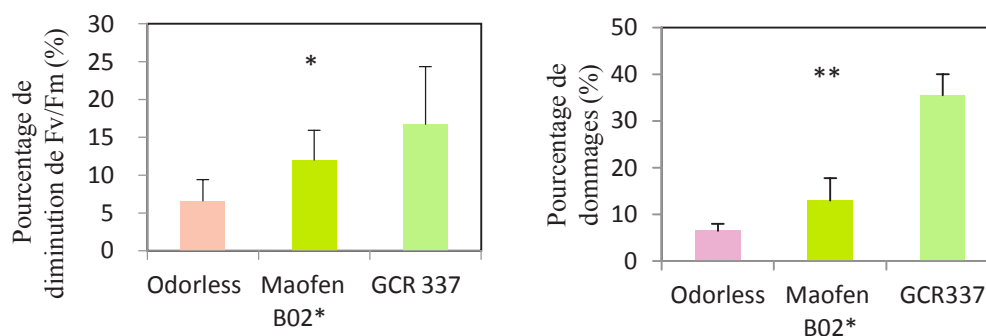


Figure 32. Pourcentage de diminution de Fv/Fm et de formation des dommages visibles chez les 3 mutants (n=5-6±SEM).

Le pourcentage de diminution de Fv/Fm était supérieur chez le mutant GCR337 par rapport aux autres génotypes (P=0.04) test Anova.

La comparaison entre les 3 mutants souligne la plus grande résistance de Odorless, suivi par le mutant poilu Maofen B02 puis le mutant non poilu GCR337 (figure 32). Etant donné que le dépôt d'O₃ chimique et les émissions de COV dans le headspace ont joué un faible rôle dans la destruction d'O₃, le dépôt cuticulaire représentait le dépôt plus élevé. Par conséquent si on rapporte le Φ_{O_3P} et $\Phi_{O_{3cutic}}$ aux densités des trichomes glandulaires (Li *et al.*, 2018), Odorless est le mutant qui présente la densité la plus élevée (résultats de Kang *et al.*, 2010, 2012, chapitre 2). Ceci était cohérent avec la résistance des mutants à l'O₃, vu que les lésions visibles ainsi que la diminution de Fv/Fm étaient clairement supérieures chez le mutant GCR337.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

La thèse avait pour objectif majeur d'examiner les propriétés antioxydantes potentielles des COV et les trichomes dans la destruction d'O₃. La moitié des COV émis par les plantes correspond à des terpènes, dont le quart sont des monoterpènes (Laothawornkitkul *et al.*, 2009). C'est pourquoi la majorité des études qui se sont intéressées aux COV biogéniques est centrée sur ces composés (Potard, 2018). Trois études ont été menées dans le cadre de ma thèse afin d'évaluer la variabilité génétique, de comprendre l'origine des COV et d'examiner plus en détail le rôle des trichomes dans la réponse des plantes à l'ozone.

1. Evaluation de la variabilité génétique et de l'origine des émissions de COV chez la tomate

La mesure des émissions des COV aériens chez les 8 parents de la population MAGIC TOM a été réalisée dans deux conditions lumineuses différentes afin de découpler les émissions issues du stockage de celles synthétisées de novo. Les résultats de cette étude ont montré que les émissions foliaires étaient composées de terpènes (mono et sesquiterpènes), dont la majorité était également stockée dans les feuilles. Elles étaient très faibles, en partie dépendantes de la lumière et différaient considérablement entre les génotypes, tant en quantité qu'en qualité. Il a été rapporté que presque tous les émetteurs de terpènes constitutifs, émettent également des mono- et sesquiterpènes synthétisés de novo d'une manière dépendante de la lumière (Grote *et al.*, 2013, Holzke *et al.*, 2006, Anagendran *et al.*, 2018). On suppose que les COV stockés sont peu mobiles à l'intérieur des cavités et ne se diffusent qu'à des taux infimes. Ce type de stockage est un mécanisme qui permet de préserver l'intégrité du trichome et donc ses fonctions écologiques tels que les défenses contre les stress biotiques et abiotiques. Outre le taux et l'origine des émissions des COV, le criblage a révélé une variabilité intraspécifique des émissions de COV entre les génotypes qui se traduit, principalement par une réduction des niveaux d'émissions de COV chez les accessions cerasiforme.

Contrairement aux émissions foliaires, les émissions de COV des racines des plantes de tomate ont été peu analysées. Nos résultats ont montré que le sol et les racines émettent également des COV à des taux quasi similaires mais bien plus variables que le feuillage et que seuls quelques composés émis se retrouvent dans des extraits de racines à de faibles concentrations. En cohérence avec les hypothèses de Falara *et al.* (2011), les analyses de corrélation entre les émissions des deux parties des plantes ont révélé que plusieurs COV émis par le feuillage et les racines sont régulés conjointement et que les émissions aériennes et souterraines pourraient être partiellement interconnectées. De fait, les COV ou leurs précurseurs peuvent être transportés entre les organes aériens et souterrains via le flux de

DISCUSSION GENERALE

sève (Maruri-López *et al.*, 2019, Duan *et al.*, 2020). Notre étude fournit de nouvelles connaissances sur la variation génotypique de la production constitutive de COV, elle est complémentaires à autres études précédentes sur les fruits des parents MAGIC TOM ainsi qu'à d'autres études sur les variations des émissions des COV en conditions stressées (annexe, tableau 4).

2. Variabilité des types et de la densité des trichomes chez la tomate en liens avec les émissions et les teneurs de COV

L'étude des différents parents et mutants de tomate avait pour objectif 1) d'examiner le rôle d'un dépôt d'O₃ chimique (à travers la réaction des COV avec l'O₃ en phase gazeuse) dans la destruction d'O₃ et la résistance des plantes au stress oxydatif (pour Castelmart et son mutant), 2) d'examiner le rôle des trichomes glandulaires dans le dépôt d'O₃ surfacique (pour Ailsa craig et son mutant), et finalement 3) d'analyser le rôle des trichomes non glandulaires (en comparant Maofen et son mutant).

Les émissions de COV variaient en qualité et quantité entre chaque parent et son mutant, en particulier entre Castelmart et son mutant Odorless qui émettait peu et ne stockait pas de COV. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Kang *et al.* (2012). Le mutant peu poilu GCR337 émettait et stockait des quantités réduites de COV monoterpènes et sesquiterpènes mais peu différentes de celles du son parent Ailsa craig. Enfin, malgré la densité importante de trichomes observés chez le mutant très poilu Maofen B02, ce génotype émettait et stockait de faibles quantités de COV comparé à son parent. Ces résultats suggèrent une relation entre la densité de trichomes glandulaires, non glandulaires et la composition et les émissions des COV. Les COV émis par ces génotypes étaient quasiment identiques à celles rapportées sur les 8 parents de MAGIC TOM dans la première étude. L'ordre de grandeur des émissions totales de COV variait de 6 (Odorless et Maofen B02 mutant) à 36.08 (Castelmart) ng m⁻²s⁻¹, confirmant le faible niveau d'émissions constitutives chez la tomate en conditions non stressées.

Les feuilles des parents et des mutants de tomates analysés contenaient les quatre types de trichomes décrits dans la littérature (Tissier *et al.*, 2017, Tissier, 2012) : les trichomes glandulaires capités et peltés, les trichomes ramifiés et les trichomes non glandulaires. Les colorations histochimiques des trichomes ont révélé la présence de terpènes et d'aldéhydes dans les trichomes glandulaires peltés et capités dans tous les parents sauvages des tomates analysées. Les mutants GCR 337, Odorless et Maofen B02 poilu différaient respectivement de

DISCUSSION GENERALE

leur parent sauvage quant à la morphologie, la composition et le type : le mutant peu poilu GCR 337 se distingue par la taille et de la morphologie réduite des trichomes, le mutant Maofen B02 par une forte densité de trichomes non glandulaires et le mutant Odorless par l'absence de COV dans les trichomes de type VI (la source majeure des COV chez la tomate). Il a été proposé qu'après leur production, la diffusion des COV dans l'atmosphère pourrait être liée à leurs localisation dans les trichomes (mais aussi à la composition de la cuticule qui pourrait faciliter ou limiter leur diffusion) (Tissier *et al.*, 2017) . L'étude de la localisation des principaux COV stockés dans les trichomes par la méthode de la fluorescence des composés a principalement mis en évidence la différence de localisation des substances entre les trichomes capités et peltés. Cette étude a montré aussi ainsi une localisation des composés sur des parties définies des trichomes, notamment sur la cuticule des trichomes, dans des visucules ou dans les cellules sécrétoires. Étant donné que l'emplacement d'un composé donné détermine sa fonction écologique (la protection et la défense) (LoPresti, 2016), on suppose que l'accumulation d'un COV sur la cuticule par exemple facilite sa diffusion et permet une réaction rapide en cas d'une attaque d'un stress (le type et les propriétés du composé accumulé joue également un rôle à faire face au facteur de stress). Contrairement à une sécrétion dans les espaces intercellulaires qui pourrait nécessiter l'implication des voies de transport pour rejeter la sécrétion à l'extérieur des trichomes. Etant donné que la présence des trichomes glandulaires participent à augmentation de la quantité de substances secrétées dans la plante (Tissier *et al.*, 2017, nos résultats de chapitre 2). La sélection des plantes cultivées vis-à-vis de ce trait pourrait permettre de cibler une production importante des COV d'intérêt pour améliorer l'autodéfense chimique de la plante.

3. Rôle des COV, du type et de la densité des trichomes dans la résistance au stress oxydatif lié à l'ozone

Dans la troisième et principale étude de la thèse, nous avons fumigé à l'O₃ les trois parents et leurs trois mutants, ainsi que les deux génotypes Cervil et LA0147 sélectionnés dans la première étude (Dehimeche *et al.*, 2021). Notre but était d'analyser le rôle des émissions de COV et des trichomes dans le dépôt d'O₃ et la résistance des plantes au stress oxydatif. Le dépôt d'O₃ sur le sol et les racines n'a pas été mesuré, puisque les racines émettent un mélange complexe de COV (alkene, composés phénoliques, alcools. ect), en outre les trichomes racinaires ne se distinguent pas entre les génotypes morphologiquement, d'autre part, les émissions des COV racinaires semblent ne pas être affectées par l'exposition à l'O₃ (Acton *et al.*, 2018).

DISCUSSION GENERALE

Nos résultats révèlent une différence de résistance des plantes de tomate analysées, notamment entre les parents et leurs mutants. Elles suggèrent l'efficacité de la densité des trichomes glandulaires à faire face au stress oxydatif à travers de l'augmentation de dépôt d'O₃ d'une part, et la sécrétion des COV réactives avec l'O₃ notamment les sesquiterpènes d'autre part, c'est le cas de Ailsa craig et son mutant GCR337 qui présente une densité inférieure des trichomes glandulaires, ce dernier était sensible à l'O₃, des différences nettes de réponses des deux génotypes contrasté ont été trouvés. En plus, la faible densité de trichomes chez le mutant GCR337 a résulté un dépôt d'O₃ non stomatique (cuticulaire et chimique) légèrement inférieur à celui de son parent.

D'autres part, une densité très élevée des trichomes non glandulaires a également peu protégé les plantes de mutant Maofen B02 des diminutions de photosynthèse, la conductance stomatique et la formation des taches visibles. Cependant, il semble ne pas avoir un effet significatif sur le dépôt d'O₃ plante et cuticulaire. On suppose que cela est dû à la composition des trichomes non glandulaires en cires qui ne réagit pas avec l'O₃ (Cape *et al.*, 2009). Cape *et al.* (2009) ont démontré que le dépôt sur la surface de la cire est de l'ordre de quelques mm s⁻¹ et que l'O₃ est généralement considéré comme ayant une très faible vitesse de décomposition du réacteur sur des surfaces composant de cire. Mais on suppose qu'il existe quand même une résistance de mutant ayant une densité des trichomes non glandulaires élevée même si ça n'a pas traduit par un dépôt d'O₃ différent à son parent. Par ailleurs, nos résultats montrent également que autres mécanismes peuvent aussi faire face à l'O₃ outre que les COV et la densité des trichomes, ce qu'a révélé notre analyse sur le mutant Odorless où on suggère que la LMA a participé à un dépôt d'O₃ légèrement supérieur chez ce mutant et à une résistance au stress oxydatif, nous supposons également que la synthèse d'autres classes des métabolites que les COV ont participé à sa résistance au stress oxydatif. La comparaison entre les trois mutants a permis de déterminer le trait contribuant le plus à la destruction d'O₃. Odorless (absence des COV constitutifs) était le plus résistant, suivi par Maofen B02 poilu (forte densité de trichomes non glandulaires), puis par GCR337 (densité des trichomes glandulaires réduite). Toutefois, les dépôts d'O₃ calculés par la différence entre les concentrations d'O₃ auxquelles les plantes ont été fumigées et exposées sont à interpréter avec prudence, étant donnée la sous-estimation des concentrations d'O₃ dans les espaces intercellulaires dans le calcul du dépôt d'O₃ stomatique (voir méthode de calculs de dépôt d'O₃), et la non prise en compte de la pilosité des trichomes dans le calcul des surfaces des plantes analysées. Les différences de réponse entre parents et mutants ont été observées pour une fumigation des plantes à 400 ppb, c'est-à-dire une exposition à 170 ppb environ. Cette réponse impliquait des

DISCUSSION GENERALE

différences de changement (diminution) de photosynthèse et de conductance stomatique et parfois une augmentation des émissions de COV LOX et des composés d'oxydation. On suggère qu'à partir de cette concentration d'O₃, les différences en caractéristiques physicochimiques des plantes jouent un rôle.

Nos résultats soulignent également, un effet très faible (<20% du dépôt total) de la réaction des COV en phase gazeuse avec l'O₃ (dépôt chimique), malgré des différences des émissions de COV entre les forts émetteurs de COV constitutifs (parents sauvages) et les faibles émetteurs (leurs mutants). Le dépôt d'O₃ chimique a différé significativement entre les mutants et leurs parents, il était plus élevé chez ces derniers. Toutefois, les différences de réactivités des COV entre les génotypes doivent être prises en compte pour une meilleure interprétation des résultats. Par exemple, α -terpinène a une constante de réactivité $K=3.74 \times 10^{-14}$ plus élevée que celles de β -caryophyllène (1.2×10^{-16}), de α -humulène (1.2×10^{-16}) et de α -copaène (8.7×10^{-16}) (voir introduction, tableau 1).

En effet, plusieurs études suggèrent que les COV et les composés organiques semi, et non volatils exsudés par les trichomes glandulaires constituent un puits d'O₃ efficace qui peut réduire les concentrations d'O₃ à la surface de la feuille et dans la phase gazeuse entourant la feuille (Loreto *et al.*, 2001, Loreto *et al.*, 2008, Jud *et al.*, 2016). Cependant dans notre étude, nous n'avons pas constaté un effet significatif de la réaction des COV en phase gazeuse avec l'O₃, on suppose que cela est fortement lié au fait que le temps de résidence des COV dans nos chambres était faible, (mais proches de conditions naturelles), par la suite les COV émis n'ont pas réagi suffisamment avec l'O₃. Mais on suppose fortement que COV ensemble avec les trichomes ont réduit les concentrations d'O₃ à la surface des feuilles.

Nos observations ont révélé que le dépôt d'O₃ cuticulaire représente la grande portion de dépôt à des concentrations d'O₃ faibles (lors de la fumigation des plantes par 100 et 200 ppb, soit une exposition à 30 et 70 ppb respectivement. À 400 et 600 ppb, le dépôt d'O₃ stomatique est parfois quasi identique au dépôt cuticulaire. En comparant nos résultats à des études précédentes, Li *et al.* (2018) ont rapporté que le pourcentage de dépôt d'O₃ non stomatique sur les plantes de tomate a représenté 40 % de dépôt total à la fumigation des plantes avec 400 ppb et 60% à l'exposition des plantes à 600 ppb d'O₃. Chez l'haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pourcentage de dépôt non stomatique a représenté environ 58% de dépôt d'O₃ totale à la fumigation des plantes à 600 ppb (Li *et al.*, 2017). Les auteurs supposent que les trichomes glandulaires capités qui tapissent les feuilles de *P. vulgaris* pourraient contribuer à la perte d'O₃. Nos résultats se situent dans la gamme des dépôts d'O₃ précédemment

DISCUSSION GENERALE

rapportés chez la tomate et l'haricot, étant donné que le dépôt d'O₃ non stomatique cuticulaire sur nos différents génotypes de tomate a représenté entre 52 et 64 % de dépôt d'O₃ total.

Kanagendran *et al.* (2018) ont analysé le dépôt d'O₃ sur les feuilles de tabac *N. tabacum* 'Wisconsin', une variété qui présente sur ses surfaces des feuilles des trichomes glandulaires contenant des terpènes. Ils ont fumigé leurs plantes avec 400, 600, 800 et 1000 ppb d'O₃, ils rapportent que le majeur dépôt d'O₃ sur les feuilles était le dépôt d'O₃ non stomatique, le dépôt d'O₃ stomatique était entre 2 et 5 nmol m⁻²s⁻¹ pendant que le dépôt d'O₃ non stomatique était entre 25 et 90 nmol m⁻²s⁻¹ au cours des 4 étapes de fumigation des plantes. Ils suggèrent que le dépôt d'O₃ élevé et la résistance des plantes est liée à une émission de novo des terpènes et à substances volatiles libérées lors de l'exposition à l'O₃. Dans notre étude, lors de l'exposition des plantes à l'O₃, additionnellement aux émissions des LOX et des acides gras indicateurs de stress, des émissions des COV aldéhydes, de dérivées de benzènes et d'alcools ont été trouvés. Il a été rapporté que ces composés peuvent se condenser à la surface des feuilles ou sur les stomates et constituer une barrière chimique à l'O₃ (Heath, 2008). Cependant, leur rôle dans la destruction d'O₃ en phase gazeuse était faible. On suppose que l'oxydation des COV peut réduire leur réactivité et leur volatilité par addition de groupes fonctionnels (Kroll *et al.*, 2008) et conduit à la formation d'espèce à poids moléculaire élevé (C> 12 par exemple). Néanmoins, dans certains cas, les processus d'oxydation peuvent aussi augmenter la volatilité des COV par clivage des liaisons carbone-carbone (Kroll *et al.*, 2008). Ces contradictions sont très probablement dues à la période de mesure des émissions (lors de l'application de stress ou en période de récupération) puisque la transformation des COV évolue au cours du temps.

Inversement aux observations de Kanagendran *et al.* (2018), chez une autre variété *Nicotiana tabacum* var. Bel W3 sensible à l'O₃, l'O₃ pénètre presque exclusivement à travers les stomates, les pertes d'O₃ causées par la diffusion à travers la cuticule ou les réactions sur la cuticule n'y contribuent pas de manière significative (Neubert *et al.* 1993). Chez le genre *Citrus* (citron, mandarine et l'orange) Fares *et al.* (2010) rapportent que suite à la fumigation des plantes avec 40, 100 et 160 ppb d'O₃, le dépôt d'O₃ sur les plantes varie entre 2 et 11 nmol m⁻²s⁻¹, les niveaux les plus élevés correspondant aux niveaux les plus élevés d'exposition à l'O₃. Nos résultats de dépôt d'O₃ à la fumigation des plantes par 100 et 200 ppb d'O₃ varient entre 7 et 18 nmol m⁻²s⁻¹. Dans leur étude, les auteurs rapportent que les pourcentages d'absorption non stomatique due à la réactivité aux COV en phase gazeuse aux trois niveaux d'exposition à l'O₃ étaient en moyenne d'environ 30% pour le citron, la mandarine et l'orange respectivement. Ils soulignent que le temps de séjour de l'air dans les enceintes (10 min) était

DISCUSSION GENERALE

suffisamment long pour permettre des réactions en phase gazeuse entre l' O_3 et les espèces chimiques les plus réactives (par exemple les sesquiterpènes et certains monoterpènes) et supposent qu'un temps de résidence de 10 min est proche des conditions naturelles avec une turbulence sous-modérées (Martens *et al.*, 2004). Dans l'étude de Fares *et al.* (2008) les pertes de l' O_3 sur la tige et la cuticule n'étaient pas importantes chez le peuplier et le chêne vert (*Quercus ilex*), le principal dépôt d' O_3 chez le peuplier émetteur principale d'isoprène était le dépôt stomatique. Chez le chêne vert le dépôt stomatique ensemble avec le dépôt d'ozone chimique ont présenté les principaux dépôts d'ozone, du fait que ce dernier est un émetteur fort de monoterpènes. Les auteurs suggèrent que cela est dû au fait que les constantes de vitesse des réactions monoterpènes O_3 sont plus élevées que celles des réactions O_3 isoprène. A l'échelle des forêts, une approche de mesure et de modélisation sur une forêt de pins dans le sud de la Californie a montré que 37% de l'élimination annuelle d' O_3 pouvait être expliquée par des réactions en phase gazeuse dans la canopée, contre 21,5% de perte sur les surfaces et 41,5% sur les stomates (Kurpius et Goldstein, 2003). Cinq ans de mesures sur une forêt d'épinettes de Norvège au Danemark ont suggéré que l'absorption stomatique ne représentait que 21% du flux total d' O_3 (Mikkelsen *et al.*, 2004). Des mesures à long terme sur les landes ont montré que l'absorption stomatique ne représentait que 30% du total sur 4 ans (Fowler *et al.*, 2001). Dans ces exemples, aucune distinction n'a été faite entre l'absorption de surface et la réaction en phase gazeuse (Fares *et al.*, 2010). Ces exemples ensemble avec nos résultats supposent que les différences des voies de dépôt d' O_3 sont liés majoritairement aux caractéristiques physico-chimique des plantes telsque l'épaisseur de la feuilles, la composition en COV et en métabolites secondaires et dépend également des conditions de mesure.

Conclusions et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode d'évaluation des effets de l'O₃ diffère selon les questions posées, entre une exposition des plantes à des niveaux d'O₃ extrêmes durant quelques heures ou au contraire une exposition à des concentrations faibles durant plusieurs mois ou années. Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'analyser les effets de l'O₃ durant quelques heures à des concentrations de l'air ambiant (30 ppb), à des concentrations élevées représentatives de régions polluées (≈ 170 ppb) et à des concentrations extrêmes très peu réalistes (≈ 300 ppb).

Le rôle des émissions de COV était faible dans la destruction d'O₃ en phase gazeuse, à cause de leurs émissions faibles d'une part, et du temps court de résidence dans la chambre d'autre part. La plupart des études qui ont rapporté un effet significatif de la destruction d'ozone par les COV en phase gazeuse ont été réalisées en forêts, là où les concentrations des COV, leurs réactivités et le temps de résidence sont élevées (Kammer, 2016, Clifton *et al.*, 2020). Cependant, on suppose que l'efficacité des COV est plus élevée en présence de trichomes à la surface des feuilles. Sauf chez *Odorless*, on suggère qu'une mutation qui provoque des grands changements des voies métabolites (suppression) d'une voie de biosynthèse courante) a provoqué d'autres changements qui ne peuvent pas être contrôlés. Nos résultats conduisent à l'idée d'une compartimentation des fonctions entre les différents trichomes glandulaires et non glandulaires, et entre les composés volatils et non volatils dans la défense des plantes contre le stress oxydatif. Cette hypothèse peut aider à comprendre les mécanismes de défense des plantes à partir des morphotypes et à sélectionner les plantes potentiellement les plus résistantes. Cependant l'étude au cours d'une phase de récupération pourrait être essentielle pour comprendre la réponse des plantes sur le long terme. Enfin, l'analyse de l'effet de l'O₃ sur des phénotypes contrastés en combinaison avec d'autres types de stress pourrait être intéressante. Etant donné que les émissions constitutives des plantes de tomate sont faibles, leur exposition à un stress biotique par exemple pourrait stimuler considérablement leurs émissions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Acton W, Jud W, Ghirardo A, Wohlfahrt G, Hewitt C N, Taylor J E, Hansel A. The Effect of Ozone Fumigation on the Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOCs) Emitted from *Brassica Napus* above- and below-Ground. *PLoS ONE*. **2018**, 12, 1–19.

Alfaro R I, Borden J H, King J N, Tomlin E S, McIntosh R L, Bohlmann J. Mechanisms of resistance in conifers against shoot infesting insects. Academic Press. **2002**, 101–126.

Allart S, Canivet A. Manuel d'analyse d'images avec le logiciel ImageJ.2017.P:32.

Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*.**2000**, 406, 512- 515.

Arimura G, Kost C, Boland W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2005**, 1734, 91-111.

Arooran k, Pazouki L, Niinemets U. Differential Regulation of Volatile Emission from *Eucalyptus Globulus* Leaves upon Single and Combined Ozone and Wounding Treatments through Recovery and Relationships with Ozone Uptake. *Environmental and Experimental Botany*. **2018**, 145, 21–38.

Ascensão L, Marques N, Pais M. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Sciences*. **1997**, 158, 249-258.

Ashmore M R. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment*. **2005**, 28, 949–964.

Atkinson R, Arey J, Sara M. Aschmann B. Yonghui S. Rate Constants for the Gas-Phase Reactions of *Cis*-3-Hexen-1-ol, *Cis*-3-Hexenylacetate, *Trans*-2-Hexenal, and Linalool with OH and NO₃ Radicals and O₃ at 296 ± 2 K, and OH Radical Formation Yields from the O₃ Reactions", *International Journal of Chemical Kinetics*. **1995**, 27, 941-955.

Atkinson R, Janet A. Atmospheric Degradation of Volatile Organic Compounds. *Chemical Reviews*. **2003**, 12, 4605–38.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

B

Bagard M. Impact de L ' Ozone Sur Les Processus Photosynthétiques et Photorespiratoires Du Peuplier (*Populus X Canescens* [Aiton] Sm.) Au Cours Du Développement Foliaire : Aspects Écophysiologiques et Cellulaires. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, **2008**.

Baier M, Kandlbinder A, Golldack D, Dietz K J. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell & Environment*. **2005**, 8, 1012-1020.

Ball T. Calculations related to gas exchange, in *Stomatal Function*. **1987**, 20, 445–476.

Beauchamp J, Wisthaler A, Hansel A, Kleist E, Miebach M, Niinemets Ü, Wildt J. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relations between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant Cell & Environment*. **2008**, 28, 1334– 1343.

Behnke K, Einhard K, Ricarda U, Wildt J, Rennenberg H, Schnitzler J P. RNAi-Mediated Suppression of Isoprene Biosynthesis in Hybrid Poplar Impacts Ozone Tolerance. *Tree Physiology*. **2009**. 25, 725–36.

Behnke K, Ehlting B, Teuber M, Bauerfeind M, Louis S, Hänsch R, Polle A, Bohlman J, Schnitzler J P. Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot. *Plant Journal* **2007**, 51, 485–499.

Bergström R, Hallquist M, Simpson D, Wildt J, Mentel T F. Biotic stress: A significant contributor to organic aerosol in Europe? *Atmospheric Chemistry and Physics*. **2014**, 14, 13603–13647.

Bernard-Degan C. Seasonal variations in energy sources and biosynthesis of terpenes in maritime pine. *Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects*. **1988**, 93- 116.

Betzberger A M, Gillespie K M, McGrath J M, Koester R P, Nelson R L, Ainsworth E A. Effects of chronic elevated ozone concentration on antioxidant capacity, photo- synthesis and seed yield of 10 soybean cultivars. *Plant Cell Environment*. **2010**, 33, 1569–1581.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Biswas K K, Foster A J, Aung T, Mahmoud S. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. *Acta Physiology Plant.***2009**, 31, 13–19.

Black V J, Black C R, Roberts J A, Stewart C A. Impact of ozone on the reproductive development of plants. *New Phytol.* **2000**, 147, 421–447.

Blande J D, Holopainen J K, Li T. Air pollution impedes plant-to-plant communication by volatiles. *Ecology Letters.***2010**, 13, 1172–1181.

Bohlmann J, Keeling C I. Terpenoid biomaterials. *Plant Journal.***2008**, 54, 656–669.

Bonfante P, Andrea G. Mechanisms Underlying Beneficial Plant - Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nature communication.***2010**, 4, 1–11.

Boughton A J, Hoover K, Felton G W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology.***2005**, 31, 2211–2216.

Bouzidi H, Fittschen C, Coddeville P, Tomas A. Photolysis of 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione: Kinetics, quantum yields, and product study in a simulation chamber. *Atmospheric Environment.***2014**, 82, 250-257.

Bussotti F, Gravano E, Grossoni P, Tani C. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica* L.) along an ecological gradient, detected with an histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytol.***1998**, 138, 469–479.

C

Calfapietra C, Scarascia Mugnozza G, Karnosky D F, Loreto F, Sharkey T D. Isoprene emission rates under elevated CO₂ and O₃ in two field-grown aspen clones differing in their sensitivity to O₃. *New Phytol.***2008**, 179, 55–61.

Calvert J G, Orlando J J, Stockwell W R, Wallington T G. The Mechanisms of Reactions Influencing Atmospheric Ozone, Oxford University Press, New York. **2015**.

Camredon M, Bernard A. L'ozone troposphérique: production/ consommation et régimes chimiques. *Pollution atmosphérique.***2007**,1404.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cape J N, Hamilton R, Heal M R. Reactive uptake of ozone at simulated leaf surfaces: implications for non-stomatal ozone flux. *Atmospheric Environment*. **2009**, 43, 1116-1123

Cardoza Y J, Alborn HT, Tumlinson J H. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *Journal of Chemical Ecology*. **2002**, 28, 161–174.

Carlsson A S, Hellgren L I, Selldén G, Sandelius S. Effects of moderately enhanced levels of ozone on the acyl lipid composition of the leaves of garden pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum*. **1994**, 91, 754-762.

Channarayappa C, Shivashankar G, Muniyappa V, Frist R H. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Canadian journal of Botany*. **1992**, 70, 2184–2192.

Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*. **2011**, 66, 212-229.

Clifton O E, Fiore A M, Massman W J, Baublitz C B, Coyle M, Emberson L, et al. Dry deposition of ozone over land: processes, measurement, and modeling. *Reviews of Geophysics*, **2020**, 58.

Conklin P L, Barth C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the responses of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environment*. **2004**, 27, 959–970.

Corrado G, Sasso R, Pasquariello M, Iodice L, Carretta A, Cascone P, Ariati L, Digilio MC, Guerrieri E, Rao R. Systemin regulates both systemic and volatile signaling in tomato plants. *Journal Chemical Ecology*. **2007**, 33, 669-681.

Corsi G, Bottega S. Glandular hairs of *Salvia officinalis*: New data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Annals of Botany*. **1999**, 84, 657–664.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

D

David R, Carde J P. Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moy- en réactif de Nadi. Comptes Rendus de l' Academie des Sciences Paris, Serie D. **1964**,258, 1338-1340.

Degenhardt J, Kollner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpène synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phyto chemistry.**2009**, 70, 1621–1637.

Dehimeche N, Buatois B, Bertin N, Staudt M. Insights into the Intraspecific Variability of the above and Belowground Emissions of Volatile Organic Compounds in Tomato. Molecules.**2021**, 26, 237.

Delory B M, Delaplace P, Fauconnier M L, du Jardin P. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? Plant and Soil.**2016**, 402, 1-26.

Dicke M, Loreto F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. Trends in Plant Science.**2010**, 15, 115–7.

Duan Q, Bonn B, Kreuzwieser J. Terpenoids are transported in the xylem sap of Norway spruce. *Plant Cell Environ.* **2020**, 43,1766–1778.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda D A, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical reviews in plant sciences.**2006**, 25, 417–440.

E

Ebukanson G J. Water stress-induced accumulation of carotenoids and protochlorophyll precursors in Zea mays seedlings. Nigerian Journal of Botany.**1989**, 2, 97-101.

F

Fall R, Monson R. Isoprene emission rate and intercellular isoprene concentration as influenced by stomatal distribution and emissions conductance, Plant Physiology.**1992**, 100, 987-992.

Fall R. Biogenic emissions of volatile organic compounds from higher plants. Reactive

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hydrocarbons in the Atmosphere. **1999**, 41–96.

Fantaye C, Degenhardt J, Gershenzon J. Plant volatiles as key players in diverse ecological interactions. *Endocytobiosis and Cell Research*. **2014**, 1–8.

Fares S, Loreto F, Kleist E, Wildt J. Stomatal Uptake and Stomatal Deposition of Ozone in Isoprene and Monoterpene Emitting Plants. *Plant Biology*. **2008**, 10, 44–54.

Fares S, Parka J H, Ormenoa E, Drew R. Gentner, McKaya M, Loreto F, Karlike J, Goldstein A H. Ozone uptake by citrus trees exposed to a range of ozone concentrations. *Atmospheric environment*. **2010**, 44, 3404-3412.

Fares S, Weber R, Park J, Gentner D, Karlik J, Goldstein A H. Ozone deposition to an orange orchard: Partitioning between stomatal and non-stomatal sinks. *Environmental Pollution*. **2012**, 169, 258-266.

Feng Z Z, Wang L, Pleijel H, Zhu J G, Kobayashi K. Differential effects of ozone on photosynthesis of winter wheat among cultivars depend on antioxidative enzymes rather than stomatal conductance. *Sci. Total Environ*. **2016**, 572, 404–411.

Finlayson-Pitts B J, Pitts J. *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*, Elsevier, San Diego, **1999**.

Frey B, Keller C, Zierold K, Schulin R. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment*. **2000**, 23, 675-687.

Fowler D, Flechard C, Cape J. N, Storeton-West R L, Coyle M. Measurements of ozone deposition to vegetation quantifying the flux, the stomatal and non-stomatal components. **2001**. *Water and Soil Pollution*, 130, 63–74.

Furr M, Mahlberg P G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*. **1981**, 44:153159.

G

Glas J J, Schimmel B C, Alba J M, Escobar-Bravo R, Schuurink R C, Kant M R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

International Journal of Molecular Sciences.**2012**, 13, 17077– 103.

Grote R, Mayrhofer S, Fischbach R J. Process-based modelling of isoprenoid emissions from evergreen leaves of *Quercus ilex* (L.). *Atmospheric Environment*.**2006**, 40, 152–165.

Grote R, Monson R K, Niinemets Ü. Leaf-level models of constitutive and stress- driven volatile organic compound emissions. *Tree physiology*.**2013**, 5, 315–355.

Grulke, N E, Paoletti E, Heath R L. Comparison of calculated and measured foliar O₃ flux in crop and forest species. *Environnement Pollution*.**2007**, 146, 640-647.

Guenther A, Geron C, Pierce T, Lamb B, Harley P, Fall R. Natural emissions of non-methane volatile organic compounds, carbon monoxide, and oxides of nitrogen from North America. *Atmospheric Environment*.**2000**, 34, 2205–2230.

H

Haroni A, Giri A P, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel W, Verstappen F, Verhoeven H A, Jongsma M A, Schwab W, Bouwmeester H J. Terpenoid metabolism in wild type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*.**2003**, 15, 2866-2884.

Heath R L. Modification of the Biochemical Pathways of Plants Induced by Ozone: What Are the Varied Routes to Change? *Environmental Pollution*.**2008**, 155, 453–463.

Heiden A C, Hoffmann T, Kahl J, Kley D, Klockow D, Langebartels C, Wildt J. Emission of volatile organic compounds from ozone- exposed plants. *Ecological Applications*, **1990**, 9, 1160–1167.

Heiden A C, Kobel K, Langebartels C, Schuh-Thomas, G, Wildt J. Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants part I: emissions from lipoxygenase activity. *Journal of Atmospheric Chemistry*.**2003**, 45, 143-172.

Hellén H, Praplan Tykkä T, Ylivinkka I, Vakkari V, Bäck, J, Petäjä T, Kulmala M, Hakola H. Long-term measurements of volatile organic compounds highlight the importance of sesquiterpenes for the atmospheric chemistry in boreal forest. *Atmospheric Chemistry and Physics*. **2018**, 13839–13863.

Holopainen, J K. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends Plant Science*.**2004**,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

9, 529–533.

Holopainen J K, Gershenzon J. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Science*.**2010**, 15, 176–184.

Holopainen J K. Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? *Tree Physiology*.**2011**, 31, 1356–1377.

Holopainen J K, Blande J D. Molecular plant volatile communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **2012**, 739, 17–31.

Holzke C, Hoffmann T, Jaeger L, Koppmann R, Zimmer W. Diurnal and seasonal variation of monoterpene and sesquiterpene emissions from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Atmospheric Environment*.**2006**, 40, 3174–3185.

I

Ibrahim M A, Stewart-Jones A, Pulkkinen J, Poppy G M, Holopainen J K. The influence of different nutrient levels on insect-induced plant volatiles in Bt and conventional oilseed rape plants. *Plant Biology*.**2008**, 10, 97–107.

IUPAC 2017. Task group on Atmospheric Chemical Kinetic Data Evaluation. Evaluated data sheets available at <http://iupac.pole-ether.fr/>.

J

Jacob D J, Field B D, Li Q, Blake D R, de Gouw J, Warneke C, Hansel A, Wisthaler A, Singh, H B, Guenther A. Global budget of methanol: Constraints from atmospheric observations. *Journal of Geophysics*.**2005**, Res. 110, D08303.

Jansen R M C, Hofstee J W, Wildt J, Verstappen F W A, Bouwmeester H J, Posthumus M A, van Henten E J. Health monitoring of plants by their emitted volatiles: trichome damage and cell membrane damage are detectable at greenhouse scale. *Annals of Applied Biology*. **2009**, 154, 441–452.

Jassbi A R, Zamanizadehnajari S, Baldwin I T. 17-Hydroxygeranyllinalool glycosides are major resistance traits of *Nicotiana obtusifolia* against attack from tobacco hornworm larvae. *Phytochemistry*. **2010**, 71, 1115–1121.

Jud W, Fischer L, Canaval E, Wohlfahrt G, Tissier A, Hansel A. Plant surface reactions:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

an opportunistic ozone defence mechanism impacting atmospheric chemistry. *Atmospheric Chemistry and Physics*.**2016**, 16-277.

K

Kalalian C. Réactivité Atmosphérique Des Composés Organiques Volatils Oxygénés Biogéniques (Aldéhydes et Alcools Insaturés). Études Cinétiques de La Réaction Entre Les Radicaux Peroxy et Le Radical Nitrate. **2018**.

KAMMER J, Etude des Aérosols Organiques Secondaires (AOS) générés par la forêt des Landes. **2016**.

Kanagendran K, Pazouki L, Li B, Liu A, Niinemets Ü. Ozone-Triggered surface uptake and stress volatile emissions in *Nicotiana tabacum* in Wisconsin. *Journal of Experimental Botany*. **2018**, 69, 681–697.

Kanakidou M, Seinfeld J H, Pandis S N, Barnes I, Dentener F J, Facchini M C, Dingenen R V, Ervens B, Nenes A, Nielsen C J. Organic aerosol and global climate modelling: a review. *Atmospheric Chemistry Physics*.**2005**, 5, 1053–1123.

Kang J H, Campos M L , Zemelis-Durfee S, Al-Haddad J M, Jones A, Telewski F W, Brandizzi F, Howe G A. Molecular cloning of the tomato Hairless gene implicates actin dynamics in trichome-mediated defense and mechanical properties of stem tissue, *Journal experiment of Botany*.**2016**, 67, 5313–5324.

Kang, J H, Shi F, Jones A D, Marks, M D, Howe, G A. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of Experimental Botany*.**2010**, 61, 1053–1064.

Karabourniotis G, Papadopoulos K, Papamarkou M, Man-etas Y. Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum*.**1992**, 84,414–418.

Karabourniotis G, Liakopoulos G. Protective and defensive roles of non - glandular trichomes against multiple stresses : structure – function coordination. *J. For. Res.* **2020**, 31, 1–12.

Kasal-slavik T, Eschweiler J, Kleist E, Roland M, Goldbach H E, Schouten A, Wildt J. Early Biotic Stress Detection in Tomato (*Solanum Lycopersicum*) by BVOC Emissions. *Phytochemistry*, **2017**, 88, 144-180.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kerstiens G, Lendzian, K J.** Interactions between ozone and plant cuticles. Ozone deposition and permeability. *New Phytologist*, **1989**, 112, 13-19.
- Kesselmeier J, Staudt M.** Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*.**1999**, 33, 23–88.
- Kettle A J, Andreae M O.** Flux of dimethylsulfide from the oceans: A comparison of updated data sets and flux models. *Journal of Geophysical Research*.**2000**, 26, 793–808.
- Kim D, Philip S, Ronald A.** Rate Constants for the Gas-Phase Reactions of OH and O₃ with beta-Ocimene, beta-Myrcene, and alpha- and beta-Farnesene as a Function of Temperature, *Journal of Physical Chemistry A*.**2011**, 115, 500-506.
- Kim, H J, Seo E, Kim J H, Cheong H, Kang B C, Choi D.** Morphological Classification of Trichomes Associated with Possible Biotic Stress Resistance in the Genus *Capsicum*.” *Plant Pathology Journal*.**2012**, 28, 107–113.
- Kleinheinz G T, Bagley S T, John W P, Rughani J R, McGinnis G D.** Characterization of alpha-pinene-degrading microorganisms and application to a bench-scale bio-filtration system for VOC degradation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **1999**, 37, 151–7.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B.** Diversity and Distribution of Floral Scent. *Botanical Review*.**2006**, 72, 1-120.
- Kortbeek R W, Xu J, Ramirez A, Spyropoulou E, Diergaarde P, Otten- Bruggeman I, de Both M, Nagel R, Schmidt A, Schuurink R C.** Engineering of tomato glandular trichomes for the production of specialized metabolites. *Methods in Enzymology*.**2016**, 576, 305–331.
- Kroll J H, Seinfeld J H.** Chemistry of Secondary Organic Aerosol: Formation and Evolution of Low-Volatility Organics in the Atmosphere. *Atmospheric Environment*.**2008**, 42, 3593–3624.
- Kurpius M R, Goldstein, A H.** Gas-phase chemistry dominates O₃ loss to a forest, implying a source of aerosols and hydroxyl radicals to the atmosphere.*Geophysical Research Letters*. **2003**,30-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

L

Laisk A, Kull O, Moldau H. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology*.**1989**, 90, 1163-1167.

Laothawornkitkul J, Jane E T, Nigel D P, Hewitt N. Biogenic Volatile Organic Compounds in the Earth System. *New Phytologist*.**2009**, 183, 27-51.

Levis S, Wiedinmyer C, Bonan G B, Guenther A. Simulating biogenic volatile organic compound emissions in the Community Climate System Model. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*.**2003**, 108,659.

Li S, Tiina T, Peter C H, Yifan J, Arooran K, Mirjam G, Kristen J, and Niinemets Ü. Glandular Trichomes as a Barrier against Atmospheric Oxidative Stress: Relationships with Ozone Uptake, Leaf Damage and Emission of LOX Products across a Diverse Set of Species. *Plant, Cell & Environnement*, **2018**, 41,1263-1277.

Liu F, Zhang X, Lu C, Zeng X, Li Y, Fu D, Wu G. Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *Journal of Experimental Botany*.**2015**, 66, 5663–5681.

Lombard J, Moreira D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Molecular Biology and Evolution*.**2011**, 28, 87–99.

LoPresti E F. Chemicals on plant surfaces as a heretofore unrecognized, but ecologically informative, class for investigations into plant defence. *Biological reviewers*.**2016**, 91, 1102–1117.

Loreto F, Harley P, Sharkey T D, Monson R K. The response of isoprene emission rate and photosynthetic rate to photon flux and nitrogen supply in aspen and white oak trees. *Plant, Cell Environment*.**1996**, 19, 549-559.

Loreto F, Schnitzler J P. Abiotic Stresses and Induced BVOCs. *Trends in Plant Science*. **2010**,15, 154–66.

Loreto F, Sharkey T D. A gas-exchange study of photosynthesis and isoprene emission in red oak (*Quercus rubra* L.). *Planta*, **1990**, 182, 523–531.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Luckwill L C. The genus *Lycopersicon*: a historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberdeen, UK: Aberdeen University Press. **1943**.

Luft S, Curio E, Tacud B. The use of olfaction in the foraging behaviour of the golden-mantled flying fox, *Pteropus pumilus*, and the greater musky fruit bat, *Ptenochirus jagori* (Megachiroptera: Pteropodidae). *Naturwissenschaften*.**2003**, 90, 84–87.

Lyons T M, Plöchl E, Turcsányi J B. Extracellular antioxidants: a protective screen against ozone? In *Environmental Pollution and Plant Responses*. **2000**, 203–222.

M

Machado S R, Gregorio E A, Guimaraes E. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria Montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany*. **2006**, 97, 357–369.

Maeda H. Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *The Annual Review of Plant Biology*.**2012**, 63, 73-105.

Maffei M E. Sites of Synthesis, Biochemistry and Functional Role of Plant Volatiles. *South African Journal of Botany*.**2010**, 76, 612–31.

Martens C, Shay T, Mendlovitz W S, Matross D M, Saleska S R, Wofsy S C, Woodward S, Menton M C, De Moura J M, Crill P M, De Moraes O L, Lima R L. Radonfluxes in tropical forest ecosystems of Brazilian Amazonia: night-time CO₂net ecosystem exchange derived from radon and eddycovariance methods. *Global Change Biology*. **2004**, 10, 618-629.

Mathur J. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell*.**2000**, 12, 465–477.

Matsui K, Sugimoto K, Kakumyan P, Khorobrykh S A, Mano J. Volatile oxylipins and related compounds formed under stress in plants. In *Lipidomics* (ed.D. Armstrong).**2010**, 17–28.

McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*.**1995**, 7, 1015–1026.

Mermet K. Caractérisation physico-chimique et réactivité d'espèces biogéniques sur un site

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

de mesure en forêt des Landes : impacts sur la qualité de l'air. Chimie analytique. Université de Bordeaux, **2019**.

Moldau H, Bichele I. Plasmalemma protection by the apoplast as assessed from above-zero ozone concentrations in leaf intercellular air spaces. *Planta*. **2002**, 3, 484-487.

Müller C, Riederer M. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*. **2005**, 31, 2621-2651.

Munien P, Yougasphree N, Gonasageran N. Micromorphology, Histochemistry and Ultrastructure of the Foliar Trichomes of *Withania Somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae). *Planta*. **2015**, 5, 242.

Murungi L K, Kirwa H, Coyne D, Teal P E A, Beck J J, Torto B. Identification of key root volatiles signaling preference of Tomato over Spinach by the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66, 7328–7336.

N

Niinemets Ü, García-Plazaola J, Tosens T. Photosynthesis during leaf development and ageing. In J. Flexas, F. Loreto, & H. Medrano (Eds.), *Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment: A Molecular, Physiological, and Ecological Approach*. **2012**, 353-372.

Niinemets Ü, Reichstein M. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: a sensitivity analysis. *Journal of Geophysical Research*. **2003**, 108, 4208.

Niinemets Ü. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*. **2010**, 260, 1623–1639.

Niinemets Ü, Fares S, Harley P, Jardine K J. Bidirectional exchange of biogenic volatiles with vegetation: Emission sources, reactions, breakdown and deposition, *Plant Cell Environ*. **2014**, 37, 1790–1809.

Niinemets Ü. Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences. *Trends in Plant Science*. **2010**, 15, 145–153.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

O

Oksanen E, Sober J, Karnosky D F. Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist*.**2004**, 161, 791-799.

Orvar B L, McPherson J, Ellis B E. Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *The Plant Journal*.**1997**, 11, 203-212.

Owen S M, Harley P, Guenther A, Hewitt N C. Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmospheric Environment*.**2002**, 36, 3147-3159.

P

Pääkkönen E, Holopainen T, Kärenlampi L. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth.) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution*.**1997**, 96, 117-127.

Pääkkönen E, Holopainen T, Kärenlampi L. Variation in ozone sensitivity among clones of *Betula pendula* and *Betula pubescens*. *Environmental Pollution*.**1997**, 95, 37-44.

Palmer-Young E C, Veit D, Gershenzon J, Schuman M C. The Sesquiterpenes (E)- β -Farnesene and (E)- α -Bergamotene Quench Ozone but Fail to Protect the Wild Tobacco *Nicotiana attenuata* from Ozone, UVB, and Drought Stresses, *Plos One*. **2015**, 10, 0127296,

Paoletti E. Impact of ozone on Mediterranean forests: A review. *Environmental Pollution*. **2006**, 144, 463-474.

Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della T G, Ferranti F. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plant. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*.**2003**, 133, 1122-1134.

Pazouki L, Niinemets Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. **2016**, 7, 1-16.

Pazouki L, Arooran K, Li S, Astrid K, Hamid R, Rudolf B, Niinemets Ü. Mono- and Sesquiterpene Release from Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Leaves upon Mild and Severe Heat Stress and through Recovery: From Gene Expression to Emission Responses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Environmental and Experimental Botany.**2016**.132, 1-15.

Peisker C, Diiggelin T, Rentsch D, Matile P. Phytol and the breakdown of chlorophyll in senescent leaves. Journal Plant Physiology.**1989**, 135, 428-32.

Peñuelas J, Llusià J. BVOCs: Plant defense against climate warming? Trends in Plant Science.**2003**, 8, 105–9.

Pichersky E, Gershenzon J. The Formation and Function of Plant Volatiles: Perfumes for Pollinator Attraction and Defense. Current Opinion in Plant Biology.**2002**, 5, 237-43.

Pichersky E, Noel J P, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: nature’s diversity and ingenuity. Science.**2006**, 311, 808–11.

Pleijel H, Danielsson H, Emberson L, Ashmore M R, Mills G. Ozone risk assessment for agricultural crops in Europe: further development of stomatal flux and flux– response relationships for European wheat and potato. Atmospheric Environnement.**2007**, 41, 3022–3040.

Polle A, Wieser G, Havranek W M. Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst) at high altitude. Plant, Cell & Environment.**1995**, 18, 681-688.

Potard K. Des Sols Dans Les Paysages Agricoles : Identification Des Sources et Incidences Sur La Qualité de l’Air. Sciences agricoles. Université Rennes 1, **2017**.

Prozherina N, Freiwald V, Rousi M. Oksanen E. Interactive effect of springtime frost and elevated ozone on early growth, foliar injuries and leaf structure of birch (*Betula pendula*). New Phytol.**2003**, 159, 623–636.

R

Raghava T, Ravikumar P, Hegde R, Kush A. Spatial and temporal volatile organic compound response of select tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. Plant Science.**2010**, 179, 520-6.

Raguso R A. More Lessons from Linalool: Insights Gained from a Ubiquitous Floral Volatile. Current Opinion in Plant Biology.**2016**, 32, 31–36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rambla J L, Tikunov Y M, Monforte A J, Bovy A G, Granell A. The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany*.**2014**, 65, 4613–4623.

Rasmann S, De Vos M, Casteel C L, Tian D, Halitschke R, Sun J Y, Agrawal A A, Felton G W, Jander G. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol*. **2012**, 158, 854–863.

Rebouças, D M. Étude Du Métabolisme Des Lipides Membranaires et Des Gènes Associés Chez *Vigna Unguiculata* (L.) Walp Sous Contraintes Abiotiques Combinées (Sécheresse / Ozone). *Ecologie, Environnement*. Université Paris-Est, Universidade Federal do Ceará). **2015**.

Renaut J, Bohler S, Hausman J F, Hoffmann L, Sergeant K, Ahsan N, Jolivet Y, Dizengremel P. The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**, 28, 495–516.

Riemenschneider D E, Sharma P, Thakur R, Sober A, Sober J, Jones W S, Anttonen S, Vapaavuori E, Mankovska B. Tropospheric O₃ moderates responses of temperate hardwood forests to elevated CO₂: a synthesis of molecular to ecosystem results from the Aspen FACE project. *Functional Ecology* **2003**, 17, 289–304.

Rodríguez-Concepción M. Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*.**2006**, 5, 1- 15.

Roelofs G J, Lelieveld J. Model study of the influence of cross-tropopause O₃ transports on tropospheric O₃ levels. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*.**1997**, 49, 38–55.

Ryan A, Cojocariu C, Possell M, Davies W J, Hewitt, C N. Defining Hybrid Poplar (*Populus Deltoides* X *Populus Trichocarpa*) Tolerance to Ozone: Identifying Key Parameters. *Plant, Cell and Environment*.**2009**, 32, 31–45.

S

Sangwan R S, Chaurasiya N D, Lal P, Misra L, Tuli R, Sangwan N S, Withanolide A. Is inherently de novo biosynthesised in roots of the medicinal plant Ashwagandha (*Withania somnifera*). *Physiologia Plantarum*.**2008**, 133, 278–287.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sarret G, Harada E, Choi Y E, Isaure M P, Geoffroy N, Fakra S, Marcus M A, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A.** Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiology*.**2006**, 141, 1021–1034.
- Sartelet K N, Couvidat F, Seigneur C, Roustan Y.** Impact of biogenic emissions on air quality over Europe and North America. *Atmospheric Environmenc*.**2012**, 53, 131–141.
- Schillmiller A L, Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau A L, Schmidt A, Wilkerson C, Last R L, Pichersky E.** Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**2009**, 106, 10865–10870.
- Schuurink R, Tissier A.** Glandular trichomes: micro-organs with model status? *New Phytologist*.**2020**, 225, 2251–2266.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R.** Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant Journal*.**2018**, 54, 712-732.
- Seinfeld J H, Pandis S N.** *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, USA, **2006**.
- Senthil K, Wasnik N G, Kim Y, Yanj D.** Generation and analysis of expressed sequence tags from leaf and root of *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Molecular Biology Reports*.**2009**, 37, 893–902.
- Shang B, Zhaozhong F, Li P, Xiangyang Y, Xu Y, Calatayud V.** Ozone Exposure- and Flux-Based Response Relationships with Photosynthesis, Leaf Morphology and Biomass in Two Poplar Clones. *Science of the Total Environment*.**2017**, 15, 185-195.
- Sharkey D T, Loreto F, Delwiche C F.** The biochemistry of isoprene emission from leaves during photosynthesis, in T. D. Sharkey, E. A. Holland, H. A. Mooney (eds), *Trace Gas Emissions by Plants*, Academic Press, New York. **1991**, 153–184.
- Sharkey T D, Loreto F.** Water stress, temperature, and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia*.**1993**, 95, 328–333.
- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J,**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Nishioka T, Matsui K, Takabayashi J. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**2006**, 103, 16672-16676.

Silva L D, Mansfield T A, McAinsh M R. Changes in Stomatal Behaviour in the Calicicle *Leontodon Hispidus* due to the Disruption by Ozone of the Regulation of Apoplastic Ca^{2+} by Trichomes. *Planta*.**2001**, 214, 158–162.

Silver G M, Fall R. Enzymatic synthesis of isoprene from dimethylallyl diphosphate in aspen leaf extracts. *Plant Physiology*.**1991**, 97, 1588-1591.

Sindelarova K, Granier C, Bouarar I, Guenther A, Tilmes S, Stavrakou T, Knorr W. Global data set of biogenic VOC emissions calculated by the MEGAN model over the last 30 years. *Atmospheric Chemistry and Physics*.**2014**, 14, 9317–9341.

Singsaas E L, Lerdau M, Winter K, Sharkey T D. Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology*.**1997**, 115, 1413–1420.

Slocombe S P, Schauvinhold I, McQuinn R P. Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched-chain fatty acid and acyl sugar production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*.**2008**, 148, 1830–1846.

Staudt M, Bertin N. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment*.**1998**, 21, 385-395.

Suzuki N, Rivero R M, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*.**2014**, 203, 32-43.

T

Taboga S R, Vilamaior P S L. *Citoquímica*. In: *A célula*. Edited by Carvalho HF, SM Recco- Pimentel. Manole LTDA, Barueri.**2001**.

Tattini M, Matteini P, Saracini E, Traversi M L, Giordano C, Agati G. Morphology and bio- chemistry of non-glandular trichomes in *Cistus salvifolius* L. leaves growing in extreme habitats of Mediterranean basin. *Plant Biology*.**2007**, 9, 411–9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Terry G M, Stokes N J. Exposure to isoprene promotes flowering in plants. *Journal of Experimental Botany*.**1995**, 46, 1629-1931.

Tian D, Tooker J, Peiffer M, Chung S H, Felton G W. Role of Trichomes in Defense against Herbivores : Comparison of Herbivore Response to Woolly and Hairless Trichome Mutants in Tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Planta*.**2012**, 236, 1053–66.

Tissier A. Glandular trichomes : what comes after expressed sequence tags ? *The plant journal*. **2012**, 70, 51–68.

Tissier A, Morgan J A, Dudareva N. Plant Volatiles: Going ‘In’ but Not ‘Out’ of Trichome Cavities. *Trends in Plant Science*.**2017**, 22, 930–938.

Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*.**2015**, 123, 127–141.

Turlings T C, Hiltbold I, Rasmann S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant Soil*.**2012**, 358, 51–60.

Turner G W, Gershenzon J, Croteau R B. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*.**2000**, 124, 665–680.

V

Valkama E, Koricheva J, Ossipov V, Ossipova S, Haukioja E, Pihlaja K. Delayed induced responses of birch glandular trichomes and leaf surface lipophilic compounds to mechanical defoliation and simulated winter browsing. *Oecologia*.**2005**, 146, 385-393.

Vaughan M M, Wang Q, Webster F X, Kiemle D, Hong Y J, Tantillo D J, Coates R M, Wray A T, Askew W, O'Donnell C. Formation of the unusual semivolatile diterpene rhizathalene by the *Arabidopsis* class I terpene synthase TPS08 in the root stele is involved in defense against belowground herbivory. *Plant Cell*.**2013**, 25, 1108–1125.

Velikova V, Tsonev T, Pinelli P, Alessio G A, Loreto F. Localized ozone fumigation system for studying ozone effects on photosynthesis, respiration, electron transport rate and isoprene emission in field grown Mediterranean oak species. *Tree Physiology*.**2005**, 25, 1523–1532.

Vickers C E, Gershenzon J, Lerdau M T, Loreto F. A unified mechanism of action for

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*.**2009**, 5, 283– 291.

W

Wagner G J, Wang E, Shepherd R W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*.**2004**, 93, 3–11.

Wayne R P. Chemistry of atmospheres. **2000**. 3rd edn. New York, USA: Oxford University Press.

Werker E. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*.**2000**, 31, 1–35.

Wildt J, Kobel K, Schuh-Thomas G, Heiden A C. Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants: part II: Emissions of saturated aldehydes. *Journal of Atmospheric Chemistry*.**2003**, 45, 173–196.

Woodward F I, Kelly C K. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*.**1995**, 131, 311–327.

Z

Zhang W, Feng Z Z, Wang X K, Niu, J F. Responses of native broadleaved woody species to elevated ozone in subtropical China. *Environmental Pollution*.**2012**, 163, 149–157.

Zhaozhong F, Büker P, Pleijel H, Emberson L, Karlsson P, Uddling J A. Unifying Explanation for Variation in Ozone Sensitivity among Woody Plants. *Global Change Biology*.**2018**, 24, 78–84.

Sites internet

<http://www.fao.org/statistics/fr/>

<https://www.planetoscope.com>

ANNEXES

Annexes du chapitre 1

1. Figures et tableaux supplémentaires de chapitre 1

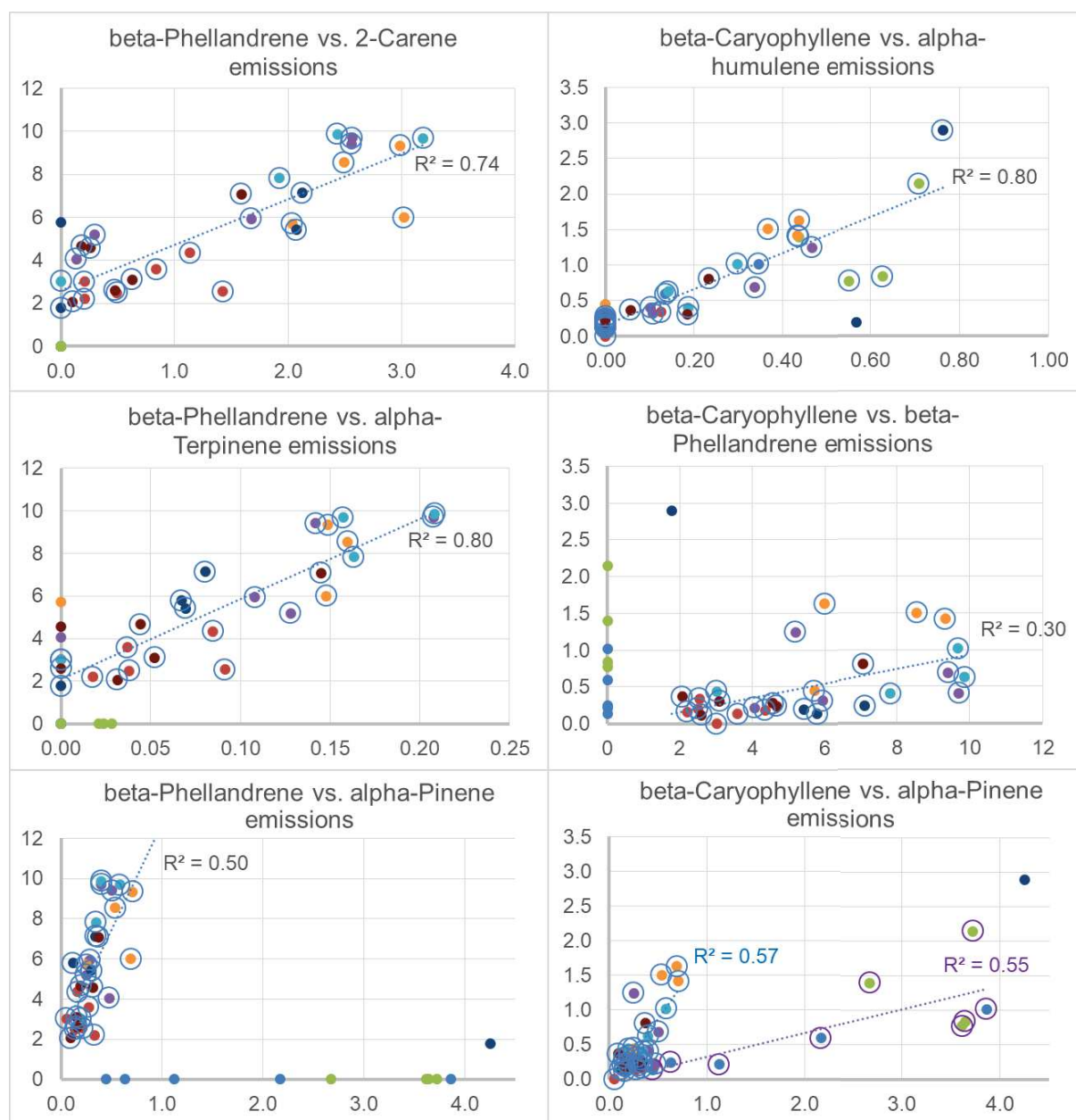


Figure 1. Examples of correlations between individual VOCs emitted by tomato foliage. Data points show measurements of single plant replicates across all genotypes (emission rates in $\text{ng s}^{-1} \text{m}^{-2}$ projected leaf surface). Different colors correspond to the different tomato genotypes as shown in Figure 4(b). Lines and coefficients of determination R^2 show the results from best fit regression analyses assuming a linear relationship. Data points without open circles were excluded from the regression analyses. Generally, the emissions of all individual monoterpenes were correlated with each other except linalool, whose emissions were unrelated to the emissions of other VOCs. The strongest correlations were found between the MTs β -phellandrene, δ -2-carene and α -terpinene (R^2 : 0.70-0.80), whereas correlations with

ANNEXES

pinenes were more moderate (R^2 : 0.50-0.57). The emissions of the major sesquiterpene β -caryophyllene were well correlated with the emissions of its structural isomer α -humulene (R^2 : 0.70-0.80), and poorly or moderately with major monoterpenes (R^2 : 0.30-0.57).

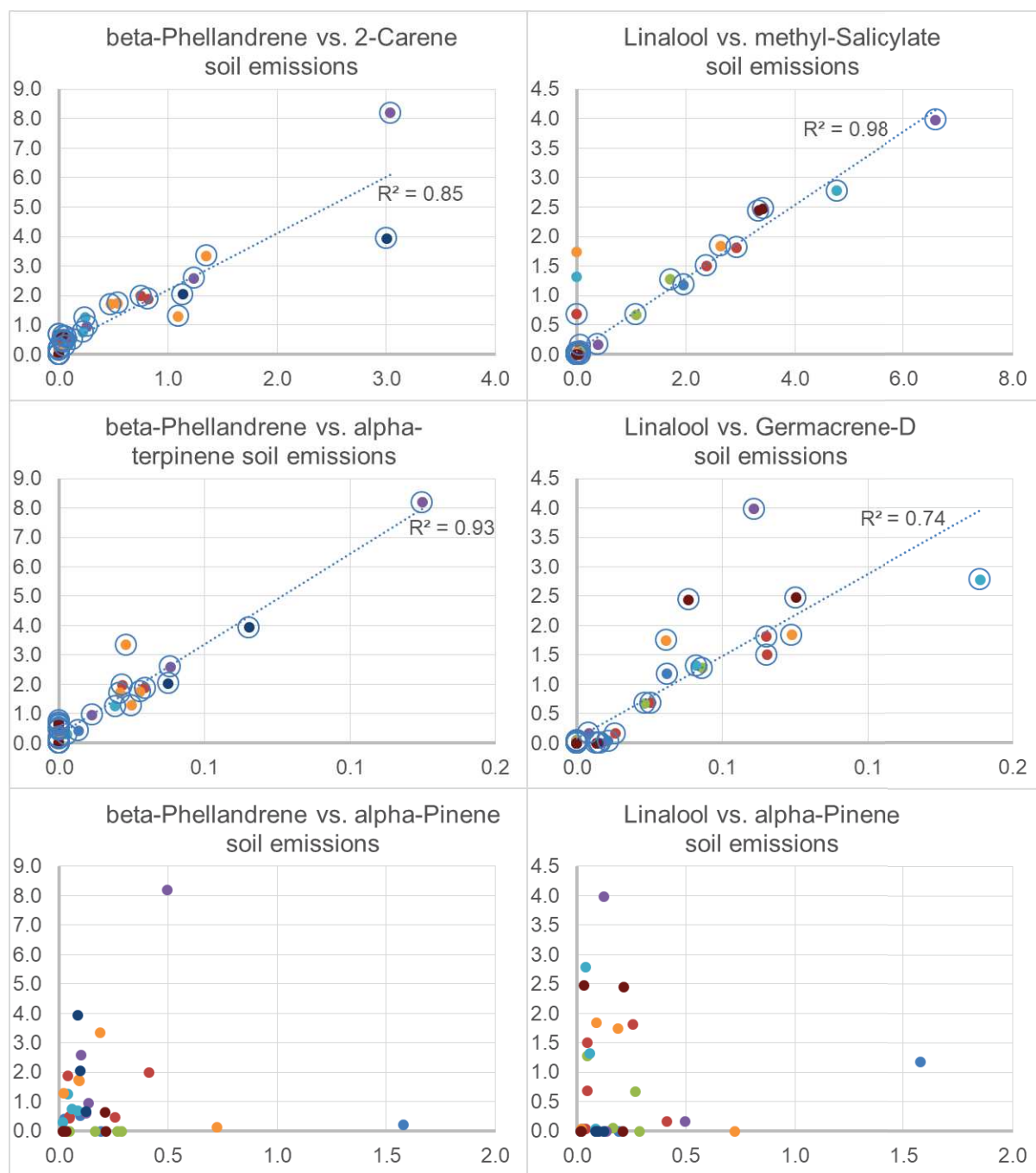


Figure 2. Examples of relations among soil emissions (ng s⁻¹ m⁻² soil surface) of individual VOCs across all genotypes. Different colors correspond to the different tomato genotypes as shown in Figure 4(b). Linear regression analyses with resulting coefficients of determination R^2 were made on the data with open circles. Generally, there were two groups of VOCs, within each one individual emission were correlated: group 1 consisted of β -phellandrene, 2-carene, α -terpinene, β -phellandrene, p-cymene and terpinolene, and group 2 of linalool,

ANNEXES

methyl-salicylate and most sesquiterpenes. Soil emissions of α - and β -pinene were unrelated to other VOCs.

Table 1. List of VOCs analyzed by GC-MS that were observed either in the emissions from foliage and/or soil and/or in the extracts of leafs and/or roots. The occurrence of each compound is indicated below the compound name as follows: **Emission from Foliage: E/F**; **Emission from Soil with Plant: E/S+P**; **Emission from Soil without Plants: E/S-P**; **Content in Leaves (leaf extract): C/L**; **Content in Roots (root extract): C/R**. VOC classes: MT: non-oxygenated monoterpenes; oxMT: oxygenated monoterpenes; SQT: non-oxygenated sesquiterpenes; oxSQT: oxygenated sesquiterpenes; Phenolic: Phenolic compound (benzenoids and phyl-propanoids); OVOC: other oxygenated compounds. * Tentative identification; ND Not Detected; ^sAdams (2005), NIST 2005, Wiley 2009.

Compound (Emission occurrence)	Formula (Molecular weight)	Assigned VOC class	Retention time	Retention index	Retention time	Retention index	Reference Retention index ^s
			GC-MS analysis emissions		GC-MS analysis extracts		
Hexanal E/S-P	C ₆ H ₁₂ O (100)	OVOC	5.43	796	ND	ND	801
Nonene E/S-P	C ₉ H ₁₈ (126)	OVOC	8.42	889	ND	ND	891
Heptanal E/S-P	C ₇ H ₁₄ O (114)	OVOC	8.7	898	ND	ND	901
α -Pinene E/F, E/S+P, C/L	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	9.81	933	11.02	939	932
3-Octen-ol* E/S+P, E/S-P	C ₈ H ₁₆ O (128)	OVOC	10.87	965	ND	ND	974
β -Pinene E/F, E/S+P	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	11.18	975	ND	ND	974
6-methyl-5-heptanone* E/S+P, E/S-P	C ₈ H ₁₄ O (126)	OVOC	11.44	983	ND	ND	981
β -Myrcene E/F, E/S+P, C/L	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	11.68	990	13.54	977	988
Octanal E/S-P	C ₈ H ₁₆ O (128)	OVOC	11.9	996	ND	ND	998
δ -2-Carene E/F, E/S+P, C/L	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	11.91	997	14.25	988	1001
α -Phellandrene E/F, E/S+P	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	12.08	1002	ND	ND	1002
unknown monoterpene E/S+P, E/S-P	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	12.3	1009	ND	ND	
α -Terpinene E/F, E/S+P	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	12.47	1015	ND	ND	1014
p-Cymene E/F, E/S+P	C ₁₀ H ₁₄ (134)	MT	12.7	1022	ND	ND	1020
β -Phellandrene E/F, E/S+P, C/L, C/R	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	12.88	1027	15.5	1025	1025
Hexanoic acid E/S+P, E/S-P	C ₈ H ₁₈ O (130)	OVOC	12.89	1028	ND	ND	1027
Phenylacetaldehyde C/R	C ₇ H ₈ O (108)	Phenolic	ND	ND	15.68	1039	1036
β -Ocimene E/F, E/S+P	C ₁₀ H ₁₆ (136)	MT	13.47	1046	ND	ND	1044
(Z)-2,6-dimethyl-2,6- Octadiene* E/F	C ₁₀ H ₁₈ (138)	MT?	13.58	1050	ND	ND	978

ANNEXES

γ-Terpinene E/F, E/S+P, E/S-P	C10H16 (136)	MT	13.82	1058	ND	ND	1054
Acetophenone E/S-P	C8H8O (120)	Phenolic	13.9	1060	ND	ND	1059
Octanol E/S-P	C8H18O (130)	OVOC	14.26	1069	ND	ND	1060
Terpinolene E/F, E/S+P	C10H16 (136)	MT	14.76	1087	ND	ND	1085
o-Guaiacol C/R	C7H8O2 (124)	Phenolic	ND	ND	17.59	1079	1087
Unknown Aldehyde C/R	C10H16O (152)	oxMT?	ND	ND	18.33	1094	
Linalool E/F, E/S+P, E/S-P	C10H18O (154)	oxMT	15.04	1096	ND	ND	1095
Nonanal E/S-P	C9H18O (142)	OVOC	15.11	1098	ND	ND	1100
unknown compound E/S+P, E/S-P	C10H20O (156)	?	15.53	1111	ND	ND	
Octanoic acid E/S-P	C18H16O2 (144)	OVOC	17.44	1175	ND	ND	1167
Methyl salicylate E/S+P, C/L, C/R	C8H8O3 (152)	Phenolic	ND	ND	22.99	1170	1190
Decanal E/S-P	C10H20O (156)	OVOC	18.14	1199	ND	ND	1201
Geraniol C/R	C10H18O (154)	oxMT	ND	ND	25.9	1228	1249
Nonanoic acid E/S-P	C9H18O (142)	OVOC	20.05	1262	ND	ND	1267
Undecanal E/S-P	C11H22O (170)	OVOC	21.06	1301	ND	ND	1305
δ-Elementene E/F, E/S+P, E/S-P, C/L	C15H24 (204)	SQT	22.11	1341	30.35	1335	1335
Eugenol C/L	C10H12O2 (164)	Phenolic	ND	ND	30.58	1350	1356
(E)-β-Caryophyllene E/F, E/S+P, C/L	C15H24 (204)	SQT	24.34	1426	34.93	1421	1417
Geranylacetone E/S-P	C13H22O (194)	oxMT	24.92	1449	ND	ND	1453
α-Humulene E/F, E/S+P, E/S-P	C15H24 (204)	SQT	25.2	1461	ND	ND	1452
Dodecanol E/S+P, E/S-P	C12H26O (186)	OVOC	25.51	1473	ND	ND	1469
Germacrene D E/F, E/S+P	C15H24 (204)	SQT	25.87	1487	ND	ND	1484
Pentadecane E/S-P	C15H32 (212)	OVOC	26.2	1500	ND	ND	1500
Dodecanoic acid E/S-P	C12H24O2 (200)	OVOC	27.66	1561	ND	ND	1565
Germacrene-4-ol* E/F	C15H26O (222)	oxSQT?	27.75	1565	ND	ND	1574
Unknown SQT E/F, E/S-P	C15H24 (204)	SQT	28.07	1578	ND	ND	
Tetradecanal E/S+P, E/S-P	C14H28O (212)	212	28.75	1606	ND	ND	1611

ANNEXES

Table 2. Emission rates (mean $\pm$ SE, n=4-6) of individual major VOCs, sum of major VOCs, sum of all monoterpenes, sum of all sesquiterpenes and sum of all compounds measured under **light** and **dark** conditions on the eight parents of the tomato MagicTom population. Please, refer to Table S1 above for the identification of minor monoterpenes and sesquiterpenes. P-values in the right column denote the significance levels for the effect of genotype based on Anova or Kruskal-Wallis tests (considered as **significant** at $P < 0.05$). Superscript letters indicates the significant differences among the individual genotypes resulting from pairwise-comparisons with Bonferroni or Dunn tests.

VOC	Cervil	Criolo	Plovdiv	LA1420	LA0147	Ferum	Levovil	Stupicke	P-value
α -Pinene	1.65 $\pm$ 0.58 ^{bc} 0.56 $\pm$ 0.10 ^a	0.20 $\pm$ 0.04 ^a 0.24 $\pm$ 0.14 ^a	3.42 $\pm$ 0.20 ^c 1.07 $\pm$ 0.25 ^a	0.38 $\pm$ 0.05 ^{abc} 0.17 $\pm$ 0.03 ^a	0.38 $\pm$ 0.07 ^{abc} 0.37 $\pm$ 0.07 ^a	0.55 $\pm$ 0.09 ^{abc} 0.50 $\pm$ 0.27 ^a	1.26 $\pm$ 0.81 ^{abc} 0.27 $\pm$ 0.10 ^a	0.22 $\pm$ 0.04 ^{ab} 0.09 $\pm$ 0.02 ^a	0.002 0.041
δ -2-Carene	0.00 $\pm$ 0.00 ^a 0.00 $\pm$ 0.00 ^a	0.72 $\pm$ 0.20 ^{ab} 0.11 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.00 $\pm$ 0.00 ^a 0.00 $\pm$ 0.00 ^a	1.45 $\pm$ 0.48 ^{ab} 0.83 $\pm$ 0.31 ^{ab}	1.89 $\pm$ 0.56 ^{ab} 1.94 $\pm$ 0.54 ^b	2.63 $\pm$ 0.19 ^b 0.50 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.50 ^{ab} 0.25 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.54 $\pm$ 0.22 ^{ab} 0.12 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.002 0.009
β -Phellandrene	0.00 $\pm$ 0.00 ^a 0.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.03 $\pm$ 0.33 ^{ab} 1.20 $\pm$ 0.11 ^{ab}	0.00 $\pm$ 0.00 ^a 0.00 $\pm$ 0.00 ^a	6.86 $\pm$ 1.04 ^b 3.26 $\pm$ 0.79 ^{ab}	7.60 $\pm$ 1.30 ^b 5.63 $\pm$ 1.02 ^b	7.39 $\pm$ 0.74 ^b 3.16 $\pm$ 0.56 ^{ab}	5.03 $\pm$ 0.93 ^{ab} 1.53 $\pm$ 0.45 ^{ab}	4.01 $\pm$ 0.75 ^{ab} 1.22 $\pm$ 0.40 ^{ab}	<0.001 0.002
Linalool	2.42 $\pm$ 0.92 0.00 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.30 0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00 0.00 $\pm$ 0.00	1.78 $\pm$ 1.44 0.00 $\pm$ 0.00	3.45 $\pm$ 1.82 0.00 $\pm$ 0.00	1.31 $\pm$ 1.07 0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01 0.00 $\pm$ 0.00	2.11 $\pm$ 0.72 0.00 $\pm$ 0.00	0.246 1
(E)- β -Caryophyllene	0.44 $\pm$ 0.15 ^{ab} 0.40 $\pm$ 0.11 ^{ab}	0.17 $\pm$ 0.05 ^a 0.14 $\pm$ 0.04 ^a	1.29 $\pm$ 0.26 ^b 0.75 $\pm$ 0.04 ^b	0.57 $\pm$ 0.17 ^{ab} 0.17 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.62 $\pm$ 0.11 ^{ab} 0.44 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.25 $\pm$ 0.22 ^b 0.21 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.87 $\pm$ 0.55 ^{ab} 0.36 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.10 ^{ab} 0.23 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.007 0.061
Sum of major VOCs	4.51 $\pm$ 0.45 ^a 0.95 $\pm$ 0.17 ^a	4.42 $\pm$ 0.59 ^a 1.69 $\pm$ 0.20 ^{ab}	4.70 $\pm$ 0.33 ^{ab} 1.82 $\pm$ 0.23 ^{ab}	11.06 $\pm$ 1.16 ^{ab} 4.43 $\pm$ 1.12 ^{ab}	13.93 $\pm$ 1.24 ^b 8.38 $\pm$ 1.64 ^b	13.13 $\pm$ 0.54 ^b 4.37 $\pm$ 0.82 ^{ab}	8.21 $\pm$ 0.67 ^{ab} 2.41 $\pm$ 0.72 ^{ab}	7.23 $\pm$ 0.87 ^{ab} 1.96 $\pm$ 0.45 ^{ab}	<0.001 0.021
Sum of Monoterpenes	4.43 $\pm$ 0.42 ^c 0.77 $\pm$ 0.13 ^a	4.53 $\pm$ 0.63 ^c 2.07 $\pm$ 0.43 ^{ab}	6.20 $\pm$ 0.96 ^c 1.13 $\pm$ 0.26 ^{ab}	11.17 $\pm$ 1.35 ^{ab} 4.53 $\pm$ 1.22 ^{ab}	14.69 $\pm$ 1.29 ^a 9.39 $\pm$ 1.81 ^b	13.48 $\pm$ 0.38 ^a 4.85 $\pm$ 0.94 ^{ab}	7.95 $\pm$ 0.68 ^{bc} 2.67 $\pm$ 0.80 ^{ab}	7.12 $\pm$ 0.85 ^{bc} 1.79 $\pm$ 0.48 ^{ab}	<0.001 0.009
Sum of Sesquiterpenes	0.67 $\pm$ 0.26 ^a 0.63 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.20 ^a 0.63 $\pm$ 0.24	2.34 $\pm$ 0.31 ^a 1.36 $\pm$ 0.04	2.17 $\pm$ 0.71 ^a 0.98 $\pm$ 0.46	1.01 $\pm$ 0.21 ^a 0.74 $\pm$ 0.13	2.10 $\pm$ 0.36 ^a 0.38 $\pm$ 0.03	1.60 $\pm$ 0.80 ^a 0.74 $\pm$ 0.26	1.10 $\pm$ 0.21 ^a 0.57 $\pm$ 0.14	0.087 0.422
Sum of all VOCs	5.10 $\pm$ 0.45 ^c 1.40 $\pm$ 0.26 ^a	5.24 $\pm$ 0.77 ^c 2.70 $\pm$ 0.66 ^{ab}	8.54 $\pm$ 0.87 ^{bc} 2.50 $\pm$ 0.23 ^{ab}	13.34 $\pm$ 1.60 ^{ab} 5.51 $\pm$ 1.56 ^{ab}	18.70 $\pm$ 1.42 ^a 10.13 $\pm$ 1.91 ^b	15.59 $\pm$ 0.44 ^a 5.23 $\pm$ 0.98 ^{ab}	9.55 $\pm$ 0.95 ^{bc} 3.43 $\pm$ 1.03 ^{ab}	8.22 $\pm$ 0.91 ^c 2.36 $\pm$ 0.47 ^{ab}	<0.001 0.022

ANNEXES

2. Variabilité des COV entre les géotypes des différentes espèces

Tableau 3 : La variabilité des COV entre les géotypes des différentes espèces (d'après Niederbacher *et al.*, 2015).

Exemples illustrant que la quantité et les mélanges des COV constitutifs et inductibles peuvent servir de marqueurs pour des géotypes spécifiques ou accessions. Les COV émis par divers organes (feuilles ou fruits) ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ou transfert de proton couplé à la spectrométrie de masse (PTR-MS).

Espèces	Focus de recherche	Inductible/constitutif	Technique de mesure des COV	Résultat	Références
Cresson de souris (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	9 accessions	Inductible par les herbivores et hormone (acide jasmonique)	Espace de tête (Tenax) GC-MS	Différence au niveau de la quantité et mélange entre les accessions et en réponse à l'induction ; identification de 73 composés.	Snoeren <i>et al.</i> (2010)
Pomme épineuse (<i>Datura wrightii</i> Regel)	8 lignées génétiques végétales utilisées et rétro-croisées depuis 3 générations.	Inductible par les herbivores et jasmonate de méthyle	GC-MS	Emission globale au minimum de 17 composés et se sont majoritairement des sesquiterpènes. L'augmentation des émissions de COVs a varié de 3.6 à > 32 fois entre les géotypes <i>D. wrightii</i> . Le composé le plus abondant était (<i>E</i>)- β -caryophyllène.	Hare (2007)
Asclépiade (<i>Asclepias syriaca</i> L.)	Variation intraspecific dans les populations naturelles : 7	Constitutif et inductible par les herbivores, variation interannuelle	GC-MS	Variation génétique dans la concentration totale et le mélange des COV constitutifs et inductibles	Wason and Hunter (2014)

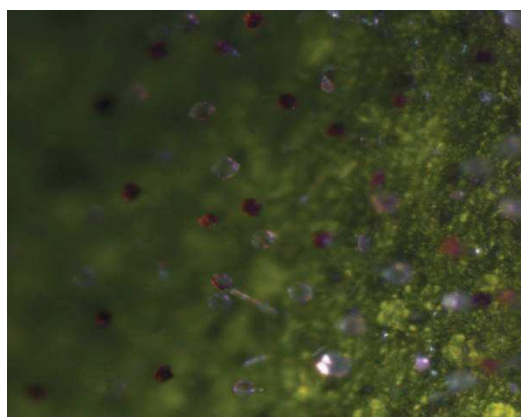
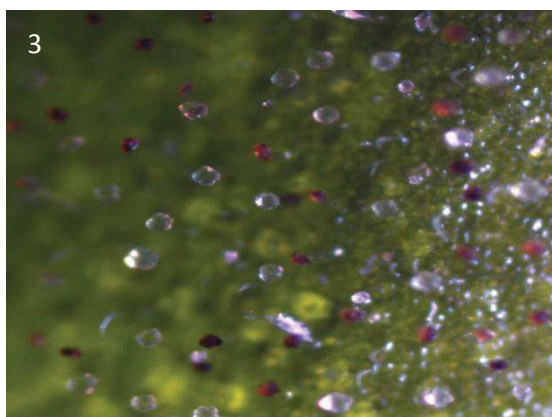
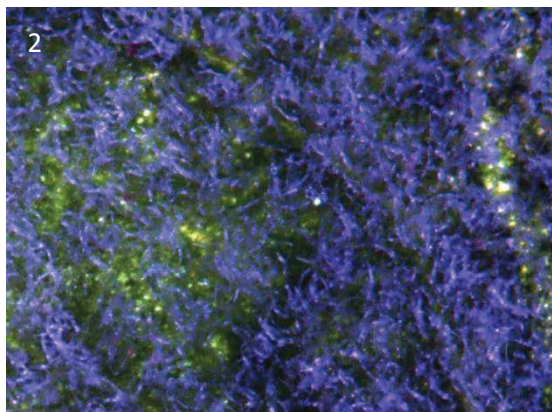
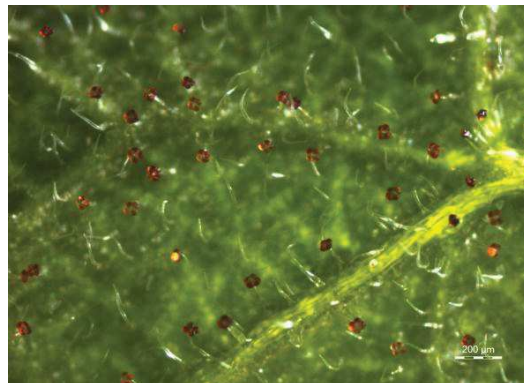
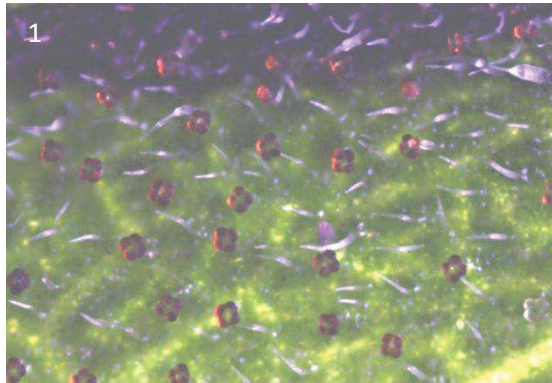
ANNEXES

	génotypes, collection sur le terrain et serres				
Peuplier (<i>Populus trichocarpa</i> Torr. & Gray ex Hook, <i>Populus deltoides</i> Bartram ex Marshall, <i>Populus nigra</i> L.)	30 génotypes, collectés sur le terrain	Constitutif et inductible par l'augmentation du CO ₂ (isoprène, méthanol, monoterpènes)	PTR-MS	Génotype et croisement parental ont prédit les émissions d'isoprène et de monoterpène. Les génotypes différaient en réponse à l'augmentation du CO ₂	Eller et <i>al.</i> (2012)
Pomme (<i>Malus x domestica</i> Borkh.)	190 accessions, fruits	Constitutif, caractérisation aromatique, empreinte digitale de COV	Espace de tête, PTR-MS, GC-MS	Accessions ont été groupées en 6 clusters basés sur la concentration de 4 groupements de COV (esters, alcools, composés carbonyle et fragments généraux)	Farnati et <i>al.</i> (2014)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	14 variétés de tomate, fruit au stade rouge	Profil aromatique, 15 volatiles (principalement aldéhydes et cétones)	Espace de tête (SPME) GC-MS (poudre de fruit) PTR-MS (fruit entier ou coupé en deux)	Les variétés peuvent être séparées, par une claire empreinte digitale entre des types de tomates (tomates rondes, cocktail et cerises). Aussi, le changement des profils volatils au cours de l'extraction et du stockage post-récolte a également été suivi par PTR-MS.	Farnati et <i>al.</i> (2012)
Truffes (<i>Tuber uncinatum</i> L.)	Différentes échelles ; génotypes, maturité du fruit et origine géographique	Constitutif, variation aromatique (COVs-C8)	Espace de tête (SPME) GC-MS	Variation aromatique (Concentration des COV- C8) est liée à la variation génotypique	Spivallio et <i>al.</i> (2012)

ANNEXES

Annexes du chapitre 2

Figures supplémentaires des trichomes des parents et de leurs mutants réalisés par microscope photonique



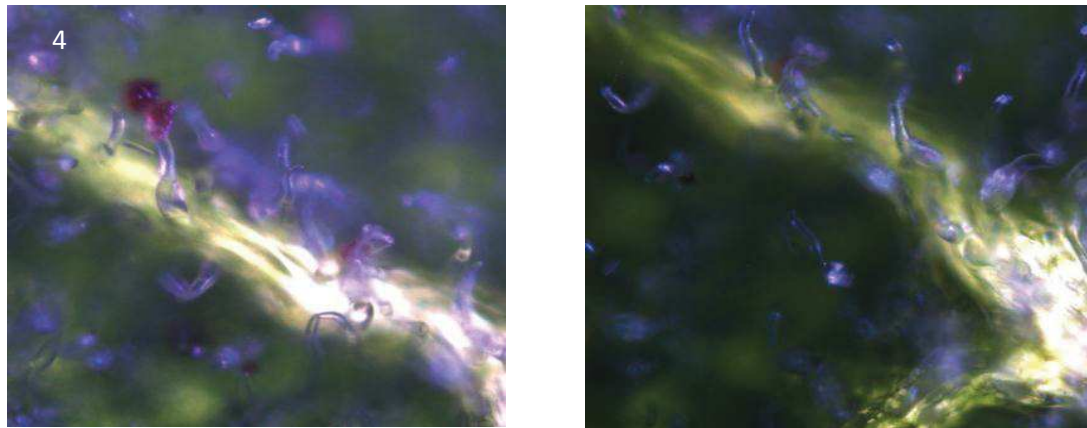


Figure 1. Images des trichomes des parents et mutants de tomate, 1 représente les trichomes glandulaires I et VI des parents sauvages : Castelmart et Alisa craig et Maofen B02, 2 : les trichomes de mutant poilu Maofen B02. 3 : trichomes glandulaire de Odorless, 4 : trichomes de parent moins poilu GCR337. Echelle barre pour 1, 2, 3 : 200 μm , 4 : 100 μm . Ces images ont été réalisées par microscopie photonique par Isabelle Bornad.

L'analyse des trichomes glandulaires des parents sauvages a montré une fluorescence principalement de la tête des trichomes VI (1). En revanche, celle du mutant Maofen B02 très poilu montre une morphologie de trichome branché (2, à droite). Les trichomes glandulaires de Odorless montre principalement des trichomes ressemblant fortement au trichome type VI, (très probablement type VII) ces derniers ont présenté une fluorescence contrairement aux trichomes type VI. L'analyse des trichomes de mutant GCR337 a montré la morphologie déformée et courbée des trichomes.

Annexes du chapitre 3

1. Analyses chimiques des métabolites secondaires complémentaires chez les plantes de Castelmart et Odorless

Afin de caractériser avantageusement les deux génotypes, et voir si la mutation chez Odorless a affecté d'autres métabolites hors des COV terpéniques, l'analyse de différents sucres solubles : glucose, fructose et saccharose, les acides organiques : amidon, acide citrique et l'acide malique, vitamine C (total et réduite), les caroténoïdes et les chlorophylles : lécithine, β -Carotène, chlorophylle B, chlorophylle A, acide néochlorogénique, acide chlorogénique et rutine et autres composés phénoliques : Kaempferol rutinoside a été réalisée sur les feuilles de Castelmart et Odorless seulement (car ce mutant était le plus déficient en COV par rapport aux autres mutants) (n=6). L'analyse a été réalisée comme suit : des feuilles adultes non sénescentes ont été collectées et la surface de leurs folioles a été déterminée. La moitié des folioles a été utilisée pour déterminer le pourcentage de la masse sèche (MS) et le LMA (poids sec/surface), et l'autre moitié a été congelée à l'azote liquide et conservée à -80°C pour réaliser les analyses biochimiques. Les échantillons ont ensuite été lyophilisés pour quantifier les concentrations en vitamine C, polyphénols, amidon, sucres solubles, acides organiques et caroténoïdes. Cette étape de lyophilisation aide à la stabilité de l'échantillon, empêche son oxydation et permet de réaliser les extractions et dosages à température ambiante (Gomez et al., 2007, Sérino et al., 2009, 2019). L'extraction de la vitamine C de la poudre lyophilisée a été effectuée par un solvant d'acide trichloroacétique à 6%. Des étapes de broyage avec vibro-oscillant et de centrifugation à froid permettent d'obtenir des extraits prêts à être dosés. Le dosage colorimétrique a été fait par microplaque et à l'aide d'agents réducteurs et d'enzymes d'oxydation de la vitamine C afin d'obtenir des gammes colorimétriques présentant la vitamine C totale, oxydée et réduite. La mesure de l'absorbance de la microplaque est réalisée à 550 nm de longueur d'onde. L'extraction des polyphénols a été réalisée par un solvant composé à 70% de méthanol et à 30% d'eau ultra pure. L'extraction de l'amidon, sucres solubles et acides organiques ont été purifiés par micro extraction à partir d'un même substrat. La séparation des extraits a été réalisée par l'ajout de deux solvants insolubles formant trois phases dans les micro-tubes lors de leur ajout : une phase supérieure hydroalcoolique contenant les acides organiques et sucres soluble, une phase centrale insoluble constituée de la matière végétale et une phase inférieure chloroformique contenant l'amidon. Le surnageant contenant les acides organiques et sucres solubles a été prélevé puis séché par centrifugation

ANNEXES

sous vide (Speed Vac SC 200 Savant). Il a ensuite été dosé par voie enzymatique sur microplaque. Le culot amidon restant a été purifié puis dosé par microplaque. Les polyphénols et les caroténoïdes ont été déterminés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC, high performance liquid chromatography). Ces analyses chimiques ont été faites à PSH-INRAE- Avignon par Béatrice Brunel.

2. Calcule des surfaces des feuilles endommagées

Les surfaces endommagées sur les feuilles après leur exposition à l’ozone ont été analysées sur le logiciel ImageJ comme suit :

L’étape de soustraction du fond est parfois nécessaire par : Process / Subtract background, suivie par l’étape de seuillage par : image/ Adjust/ Threshold, ne pas cliquer sur Apply. Et puis lancement le plugin Analyze Particles (Analyze/ Analyze particles): Ce plugin réalise une analyse en composantes où chacun objet se fait attribuer par une étiquette. Un objet est donc constitué de l'ensemble des pixels porteurs d'une même étiquette (une seule étiquette puisque les taches étaient de forme quasi identique constituant une masse. Deux grands objets sont donc distingués : la partie de foliole saines (sans taches) et la partie composantes de l’ensemble des taches. Sur l’onglet summarize (il est aussi possible d’afficher la surface objet par objet via l’onglet display results (Allart et Canivet, 2017).

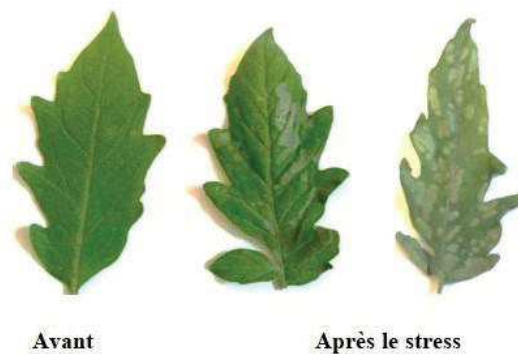


Figure 1. Exemple des lésions visibles sur les feuilles après leur exposition à l’ozone.

ANNEXES

Tableau 1. Liste des nouveaux COV émis (en noir) et stockés (en bleu), émis et stocké (en vert) analysés par GC-MS qui ont été observés pendant et après exposition des plantes à l'O₃ classés selon leur temps de rétention. Les autres composés sont cités dans le tableau 1 de l'annexe de chapitre 1. PM : poids moléculaire, TR : temps de rétention, IR : indice de rétention, IR ref : indice de rétention de référence : Adams ou la base pherobase : *

Composés	Formule	PM	(TR)	(IR)	(IR) réf
pentanal	C ₅ H ₁₀ O	86	2.45	697	704
2,3, butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	4.68	771	769*
3,4 hexanedione	C ₆ H ₁₂ O	114	7.04	846	889
éthyl benzene	C ₈ H ₁₀	106	8.42	889	894*
acide valérique	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	8.5	892	904*
acide hexanoïque	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	11.62	988	983
2-éthylhexanol	C ₈ H ₁₈ O	130	12.83	1026	1027
acétophénone	C ₈ H ₈ O	202	13.9	1060	1059
acide benzoïque	C ₇ H ₆ O ₂	122	17.46	1176	1171
phenoxethol	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	18.67	1216	1226*
acide nonaoïque	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	20.05	1262	1267
acide decanoïque	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	22.75	1365	1364
tétradécène	C ₁₄ H ₂₈	196	23.00	1374	1388
dodecanal	C ₁₂ H ₂₄ O	184	23.79	1404	1408
dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	25.15	1458	1469
tridecanal	C ₁₃ H ₂₆ O	198	26.33	1505	1509
acide dodecanoïque	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	27.66	1561	1565
hexadécène	C ₁₆ H ₃₂	224	27.94	1573	1588
octadécène	C ₁₈ H ₃₆	252	32.39	1772	1789
2 éthyl hexenyl benzoate	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	204	33.16	1908	1587*
acide hexadecanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	36.01	1951	1959
acide-α-linaloïque	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	38.33	2147	2132
z-phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	38.58	2158	2114

ANNEXES

Tableau 2. Émissions des COV avant [O₃]=0 ppb et au cours de l'exposition de Castelmart : Cas et son mutant Odorless : Odor à l'O₃ (n=3± SEM), P représente la significativité de la différence entre les deux génotypes pour chaque COV, à chaque concentration d'O₃, test de student significatif à P≤0.1.

[O ₃] ppb		0 ppb			100 ppb			200 ppb			400 ppb			600 ppb		
COV		Cas	Odor	P	Cas	Odor	P	Cas	Odor	P	Cas	Odor	P	Cas	Odor	P
Terpènes	α-pinène	0.18±0.03	0.22±0.20	0.86	0.25±0.08	0.17±0.22	0.70	0.31±0.27	0.22±0.20	0.77	0.04±0.05	0.10±0.05	0.56	0	0.25±0.25	0.42
	α-phellandrene	0.19±0.12	0.05±0.04	0.35	0	0		0	0		0	0		0	0	
	P-cymène	0.43±0.25	0.19±0.10	0.48	0	0		0	0		0	0		0	0	
	β-phellandrene	6.26±1.26	3.24±1.76	0.45	0	0		0	0		0	0		0	0	
	α-terpiniol	1.06±0.35	0.8±1.07	0.99	0	0		0	0		0	0		0	0	
	(E)β-caryophyllène	0.22±0.1	0.08±0.08	0.47	0	0		0	0		0	0		0	0	
LOX	2,3, butanediol	0	0		2.70±2.53	3.62±2.41	0.75	8.11±8.8	2.98±2.14	0.54	5.72±5.81	3.68±2.45	0.70	2.92±2.90	8.39±2.62	0.30
	pentanal	0	0		0.024±0.03	2.48±1.83	0.15	0.007±0.006	2.23±2.97	0.38	0.08±0.11	1.16±1.01	0.25	0.57±0.13	0.39±0.38	0.71
	hexanal	0	0		13.85±2.93	6.78±6.04	0.38	17.75±8.22	9.79±9.09	0.51	22.66±4.35	13.54±18	0.55	25.24±0.86	0	0.001
	3,4, hexanedione	0	0		33.29±1.21	27.21±18.14	0.68	47.79±11.78	27.54±15.76	0.25	59.92±11.72	47.33±17.44	0.50	63.91±1.77	51.63±22.00	0.63
	acide valérique	0	0		2.65±1.08	2.58±1.59	0.97	2.19±1.32	3.57±2.36	0.56	2.85±0.70	2.93±1.24	0.95	0.78±0.70	3.36±2.95	0.49
	acide hexanoïque	0	0		11.79±2.67	8.56±5.62	0.53	7.24±4.54	6.82±4.54	0.95	8.72±3.96	7.26±1.02	0.67	8.96±8.96	5.26±5	0.76
Alcools	2-éthylhexanol	0	0		3.73±4.96	3.51±2.34	0.96	5.14±2.90	2.85±1.89	0.45	1.84±2	1.27±0.98	0.79	1.08±0.85	12.10±11.54	0.44
	Phenoxethol	4.02±2.03	0	0.32	5.67±2.26	1.38±1.03	0.11	4.94±4.15	1.31±0.95	0.34	2.76±1.84	2.00±0.92	0.68	0.83±0.80	2.10±0.15	0.27
Benzènes et dérivées	éthyl benzene	0	0		5.30±1.41	10.25±7.60	0.44	3.47±1.08	8.23±5.52	0.32	1.19±1.5	2.22±1.47	0.56	0.94±0.90	0	0.42
	acide benzoïque	1.45±0.96	1.89±0.65	0.72	5.81±3.39	5.89±3.92	0.99	2.22±2.95	8.19±5.45	0.27	8.43±5.62	8.97±11	0.96	0	0	
	acetophenone	0	0		3.65±3.10	4.89±1.36	0.67	6.36±4.24	11.35±6.33	0.44	11.07±7.50	10.58±0.87	0.94	15.11±11.32	17.15±0.68	0.87
Aldéhydes	heptanal	6.25±4.16	1.10±1.09	0.33	15.01±4.69	13.81±9.20	0.89	19.94±7.54	12.66±8.44	0.46	19.58±1.21	21.94±11.72	0.80	20.69±4.58	20.06±18.11	0.98
	octanal	13.07±8.71	5.38±5.37	0.48	24.49±12.10	32.34±21.56	0.70	31.51±12.39	28.34±18.89	0.87	38.71±8.96	42.79±28.52	0.87	40.55±6.91	39.10±39	0.97
	undecanal	3.31±2.27	1.68±1	0.60	8.52±2.74	9.91±6.60	0.81	10.91±3.77	9.41±6.27	0.80	10.24±1.88	8.94±5.95	0.80	8.74±1.29	7.92±7	0.93
	dodecanal	2.25±2.30	5.21±5.00	0.56	4.53±3.02	5.56±3.70	0.79	5.93±2.98	6.41±4.27	0.91	5.91±1.83	4.43±2.95	0.65	3.17±0.53	5.53±5.50	0.71
	tridecanal	0	0		0.70±0.56	1.17±0.77	0.56	0.51±0.56	1.60±1.90	0.51	0.38±0.50	0.45±0.5	0.92	0.11±0.10	0.52±0.51	0.52
Acides gras	acide dodecanoïque	0	0		3.77±3.04	1.51±2.04	0.47	6.77±7	8.41±5.93	0.84	4.28±0.67	8.38±3.18	0.19	13.61±1.59	4.19±4.10	0.17
	acide hexadecanoïque	0	0		0	0		0	0		65.15±31.03	121.75±16.75	0.13	105.30±19.26	26.47±26.00	0.14

ANNEXES

Tableau 3. Émissions des COV [avant O₃]=0 ppb et au cours de l'exposition de Ailsa crig (Ailsa) et son mutant GCR337 (GCR) à l'O₃ (n=3±SEM), P représente la significativité de la différence entre les deux génotypes pour chaque COV, à chaque concentration d'O₃, test de student : significatif à P≤0.1.

[O ₃] ppb		0 ppb			100 ppb			200 ppb			400 ppb			600 ppb		
COV		Ailsa	GCR	P	Ailsa	GCR	P	Ailsa	GCR	P	Ailsa	GCR	P	Ailsa	GCR337	P
Terpènes	α-pinène	1.24±1.20	1.15±0.76	0.95	0.36±0.30	0.76±0.67	0.54	0.20±0.21	1.32±0.75	0.15	0	0.70±0.46	0.12	0	0.67±0.47	0.13
	p-cymène	0	0.76±0.50	0.23	0.29±0.24	1.12±0.74	0.28	0.91±0.83	1.70±0.27	0.31	0	0.90±0.59	0.12	0	0.70±0.46	0.12
	Sesquiterpène inconnu	6.16±1.67	1.75±2.30	0.19												
	2.3, butanediol	0.60±0.60	0.50±0.33	0.87	0	3.33±1.28	0.03	1.74±1.15	0.75±0.90	0.45	1.56±2.00	4.14±2.76	0.39	5.52±3.68	12.29±6.04	0.31
LOX	pentanal	0.5±0.45	0	0.23	0.88±0.90	0.73±0.97	0.89	0.007±0.008	0.06±0.08	0.42	0.33±0.40	2.38±2.19	0.30	0.22±0.20	0.14±0.10	0.76
	hexanal	0.24±0.20	0.40±0.50	0.79	15.06±7.04	15.50±10.33	0.97	19.46±4.97	28.46±3.61	0.13	8.91±11	21.07±12.13	0.40	19.19±13.77	41.55±9.07	0.18
	3.4, hexanedione	0	0		28.78±9.94	24.44±16.29	0.79	33.16±29.39	45.87±9.31	0.63	0	47.92±13.67	0.02	0	0	
	acide valérique	0	0		1.06±1.4	3.53±2.35	0.32	6.94±8	3.62±2.41	0.66	1.33±1.53	3.50±2.20	0.34	7.74±8	12.80±11.9	0.67
	acide hexanoïque	0	0		19.47±6.33	17.53±0.92	0.71	9.66±4.40	18.40±5.30	0.19	12.70±5.81	14.57±6.47	0.80	9.98±4.25	18.68±6.02	0.23
Alcools	2-éthylhexanol	0	0		0	0		3.84±2.46	0	0.12	0.12±0.10	0	0.37	0.50±0.33	11.34±8.44	0.19
	dodecanol	0	0		1.93±1.92	3.62±3.35	0.60	0.38±0.50	1.66±1.62	0.38	1.98±2	3.54±2.39	0.61	2.82±2.07	6.73±1.34	0.13
Benzènes et dérivées	ethylbenzène	0	0.60±0.39	0.23	2.01±0.69	0.40±0.54	0.07	1.64±1.08	2.12±1.72	0.79	0.96±1.00	0.26±0.30	0.52	1.92±1.49	0.89±1.10	0.53
	acide benzoïque	1.51±1.50	1.30±0.45	0.24	1.89±1.25	11.35±9.53	0.28	2.71±2.3	25.61±15.88	0.15	0	7.27±3.44	0.05	0	4.94±3.29	0.12
	2 ethyl Hexenyl benzoate	0	0		0	0		0	0		11.71±8.88	5.06±5	0.49	5.68±3.78	23.73±12.67	0.15
	acétophénone	0	0		1.40±0.93	13.03±11.39	0.26	9.33±2.84	18.34±8.68	0.26	0	57.59±16.65	0.01	63.76±36.67	95.69±33.91	0.46
Aldéhydes	heptanal	3.22±3.20	4.00±5.00	0.91	17.60±11.21	9.09±6.06	0.43	25.20±13.74	27.14±11.31	0.90	3.23±3.20	24.39±15.75	0.18	28.64±21.10	37.77±6.81	0.64
	octanal	3.40±1.62	0	0.07	20.30±2.49	31.60±21.06	0.56	33.65±14.42	53.85±13.78	0.25	0	49.66±29.59	0.10	49.48±39.39	69.42±27.02	0.62
	undecanal	5.17±4.21	0.75±0.50	0.26	9.54±2.51	4.55±2.69	0.16	9.98±3.83	19.90±11.38	0.35	0	0		0	0	
	dodecanal	0	0		6.14±1.52	1.48±1.50	0.05	4.82±1.92	9.89±6.19	0.39	20.40±5.85	7.84±10	0.24	4.27±5	0	0.37
Acides gras	acide decanoïque	0	0		6.34	23.67±9.08	0.64	24.12±6.89	19.61±13.07	0.72	5.15±6	8.47±5.76	0.65	7.68±6.21	12.34±2.91	0.44
	acide dodecanoïque	40.27±12.26	17.41±5.37	0.12	2.15±1.56	8.68±5.79	0.27	5.11±3.40	7.81±6.39	0.65	1.87±1.24	1.36±1.80	0.77	1.0054	6.25±4.16	0.23
	acide hexadecanoïque	0	0		0	4.202719	0.30	1.8896176	0.8217969	0.43	0	13.60±12.96	0.24	0	52.60±28.72	0.07

ANNEXES

Tableau 4. Émissions des COV avant [O₃]=0 ppb et au cours de l'exposition de parent Maofen B02 (Mao) et son mutant Maofen B02 (Mao*) à l'O₃ (n=3± SEM), P représente la significativité de la différence entre les deux génotypes pour chaque COV, à chaque concentration d'O₃, test de student : significatif à P≤0.1.

[O ₃] ppb		0 ppb			100 ppb			200 ppb			400 ppb			600 ppb		
	COV	Mao	Mao*	P	Mao	Mao*	P	Mao	Mao*	P	Mao	Mao*	P	Mao	Mao*	P
Terpènes	α-pinène	0.30±0.20	0.64±0.5	0.50	0.61±0.06	0.02±0.02	0.0004	0.20±0.2	0.24±0.15	0.87	0	0		0	0	
	β-phellandrene	5.38±3.74	2.91±1.94	0.48	0	0		0	0		0	0		0	0	
	β-caryophellene	0.20±0.13	0	0.12	0	0		0	0		0	0		0	0	
	2,3 butanediol	0	0		3.14±2.29	0.07±0.08	0.18	6.84±3.70	3.05±3.6	0.39	4.65±3.09	0	0.24	4.15±2.76	4.02±2.67	0.96
	hexanal	2.19±2.10	6.03±4.28	0.41	19.46±2.28	15.60±3.58	0.33	25.69±4.28	25.26±10.25	0.96	29.88±5.39	47.48±5.69	0.08	15.00±10.00	38.43±16.21	0.21
	3,4 hexanedione	3.42±3.33	8.54±3.31	0.23	40.68±24.28	32.42±16.26	0.74	42.08±23.10	43.76±38.30	0.96	51.57±33.06	66.23±10.64	0.69	19.14±11.75	66.70±18.96	0.06
	acide valérique	0	0	0.14	2.27±0.87	1.52±1.01	0.52	0	2.50±1.66	0.13	1.33±0.88	2.96±2.90	0.54	0.007±0.009	1.60±1.90	0.33
LOX	acide hexanoïque	0	0		7.30±8	11.89±5.97	0.58	9.57±8.03	15.90±2.99	0.40	11.05±8.15	27.52±1.88	0.14	2.03±1.35	20.26±13.50	0.14
	2-éthylhexanol	0	0		0	2.58±1.72	0.11	2.97±2.04	0.90±0.59	0.31	0.53±0.70	12.21±10.08	0.22	0.43±0.56	0	0.37
Alcools	dodecanol				0.80±1.00	1.75±1.70	0.57	2.04±2.00	2.17±1.44	0.95	1.65±1.53	1.12±0.01	0.75	0.18±0.10	0	0.26
benzène et dérivés	acide benzoïque	0	0		17.72±13.50	5.11±6.80	0.36	1.79±2.00	0	0.49	1.79±2.00	0	0.50	0.15±0.20	0	0.37
	acetophenone				3.26±2.17	1.94±1.43	0.57	5.97±3.28	7.05±1.93	0.72	11.39±5.05	18.14±4.75	0.35	10.66±7.34	26.51±4.38	0.09
Aldéhydes	heptanal	2.83±3	6.42±1.36	0.30	18.23±12.03	12.43±2.56	0.57	20.52±7.09	23.90±6.45	0.66	24.64±13.63	45.28±11.45	0.28	9.57±4.51	36.53±13.97	0.09
	octanal	2.77±3	13.14±2.04	0.03	31.83±12.81	31.21±7.70	0.96	40.49±10.68	50.30±23.93	0.65	45.55±19.46	72.98±3.25	0.25	18.25±11.95	65.21±19.92	0.06
	undecanal	0.83±0.55	3.67±0.98	0.03	11.25±5.51	8.91±1.58	0.65	13.48±5.40	10.76±2.67	0.59	10.86±7.24	19.85±1.96	0.31	2.32±2.58	9.80±4.37	0.15
	dodecanal	0.99±0.70	2.25±0.77	0.22	6.44±4.29	4.34±0.86	0.58	6.82±4.54	4.52±1.20	0.55	3.71±2.69	10.31±3.17	0.18	1.14±1.1	4.82±3.41	0.26
Acides gras	acide hexadecanoïque	1.15181	4.2298	0.08	4.19±2.79	2.17±2.8	0.55	0	8.54±5.69	0.15	0	5.77±0.29	0.0001	0.49±0.64	5.44±3.94	0.17
	acide nonaoïque	0	0		17.54±12.78	6.01±5.38	0.37	24.55±16.36	18.31±12.20	0.71	12.72±8.48	0	0.26	0	0	0.41
	acide decanoïque	10.80±2.57	7.99±3.64	0.48	21.31±15.49	9.26±1.75	0.36	27.30±13.63	7.02±4.67	0.14	10.26±6.84	0	0.25	7.58±5.05	8.48±8.00	0.91