

UNIVERSITE DE FLORENCE
DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE, D'EPIDEMIOLOGIE ET DE CHIMIE
ANALYTIQUE DE L'ENVIRONNEMENT

UNIVERSITE DE BOLOGNE

DOCTORAT DE RECHERCHES EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT
X CYCLE

Dissertation finale de

Dr Cheikh Tidiane DIOP

**LE RÔLE DES ENZYMES DÉTOXIFIANTS DANS LA RÉPONSE DES
PLANTES A L'OZONE**

Tuteur:

Prof. Ivano BERTINI

Coordinateur:

Prof. Marco MASCINI

Département de Chimie

Université de Florence

Via G.Capponi, 5021-Florence (ITALIE)

Février 1998

Remerciements

A mes très chers parents

Je dédie ce travail à ma Maman "paix à son âme"

Ce travail a pu être réalisé, dans le cadre de la Coopération Italiano-Sénégalaise, grâce à une bourse d'études du Ministère des Affaires Etrangères Italiennes.

Au terme de ce travail (nouvelle ligne de recherche environnementale, un des défis majeurs plus préoccupants pour l'économie contemporaine), pour lequel la thématique a été définie par le Professeur Ivano BERTINI, je souhaiterai remercier le Docteur Luigi MESSORI, Chercheur, qui a renforcé de plus mon goût à l'application de la Chimie à la Biologie.

Mes remerciements vont à tout le personnel du Laboratoire de Chimie Inorganique et Bio inorganique et à tous ceux qui ont contribué à ma formation.

"La planète Terre ne nous a pas été léguée par nos ancêtres, mais nous l'avons plutôt empruntée à notre postérité "

Proverbe du Cachemire

Sommaire

INTRODUCTION	1
1. L’ozone dans l’atmosphère	1
1.1 La photochimie du chlorofluorocarbone et le trou d’ozone.....	4
2. Interaction Ozone-Plante	5
2.1 La formation de l’ozone troposphérique.....	5
2.2 Les mécanismes du dommage dans les plantes	5
2.3 L’entrée de l’ozone dans les plantes	7
2.4 Les changements cellulaires et les dommages.....	8
3. Le système de défense des plantes	10
3.1 Le dommage dû à l’ozone.....	10
4. L’induction des systèmes de défense de la plante de la part de l’ozone.....	13
4.1 La synthèse de l’éthylène en réponse au stress dû à l’ozone	13
5. Induction de la synthèse des polyamines en réponse à l’ozone.....	14
5.1 Le rôle des polyamines comme nettoyeurs des radicaux.....	15
5.2 L’induction des pathways du phényle propanoïde et des flavonoïdes au stress d’ozone	16
5.3 L’induction par l’ozone des protéines et des gènes de la réponse pathogène.....	17
5.4 Induction des systèmes détoxificateurs des espèces d’oxygène actif en réponse au stress oxydatif.....	18
6. La concertation entre les divers systèmes de réponse à l’ozone	21
6.1 Les pathways des réactions de défenses induits par l’ozone	21
6.2 L’explosion oxydative	22
6.3 La possible action de l’acide jasmonique comme signal transducteur de l’induction par l’ozone	22
6.4 L’éthylène comme signal transducteur	23
7. Bio marqueurs et leur signification.....	24
7.1 Possibles biomarqueurs : la littérature	25
8. But de la recherche et la stratégie adoptée	27
MATERIEL ET METHODE.....	29
9. Modèle expérimental pour la réponse à l’ozone de <i>Phaseolus vulgaris</i>: germination et fumigation.....	29
10. Modèle expérimental pour la réponse à l’ozone de <i>Conyza bonariensis</i>: germination, exposition à l’ozone traitement au paraquat.....	30

11. Modèle expérimental pour la réponse à l’ozone d’<i>Arabidopsis thaliana</i>: germination et exposition à l’ozone.....	31
12. Préparation des extraits végétaux de <i>Phaseolus vulgaris</i>, <i>Conyza bonariensis</i>, <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	32
13. Mesures spectrophotométriques des concentrations protéiques	33
14. Détermination de l’activité de la SOD, utilisant le cytochrome c et la xanthine oxydase	33
14.1 Détermination de l’activité de la POD.....	36
14.2 Détermination de l’activité Gaïacol peroxydase.....	40
14.3 Détermination de l’activité de l’ascorbate peroxydase.....	42
14.4 Détermination de l’activité de la Syringaldazine.....	42
RESULTATS.....	43
15. Recherche des bases moléculaires de la résistance : le haricot Pinto-Groffi.....	43
15.1 Activité des peroxydases	43
15.2 Activité de la superoxyde dismutase.....	47
16. Recherche des bases moléculaires de la résistance: <i>Conyza bonariensis</i>	48
16.1 Activité des peroxydases et de la superoxyde dismutase.....	49
16.2 L’exposition au paraquat	49
16.3 L’exposition à l’ozone	53
16.4 Analyse comparée des données de <i>Conyza bonariensis</i>	57
17. Recherche des bases moléculaires de la résistance: <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	59
DISCUSSION.....	65
18. Le <i>Phaseolus vulgaris</i>.....	65
19. <i>Conyza bonariensis</i>	69
20. <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	73
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	76
21. Le bio monitoring	76
21.1 Les plantes et la pollution de l’air en ville.....	76
21.2 Les feuilles, siège préférentiel de l’absorption des PAP.....	76
21.3 Spécificité des symptômes	77
21.4 Les plantes espions	77
21.5 Les plantes dans l’atmosphère de la ville	78
21.6 Les plantes dans l’environnement urbain comme bio indicatrices de la pollution	79
21.7 Les plantes comme épuratrices environnementales.....	80

INTRODUCTION

1. L'ozone dans l'atmosphère

L'atmosphère est constituée des gaz qui entourent la terre. La chimie de l'atmosphère évolue significativement avec l'altitude à cause des concentrations variables des différents éléments présents et de l'effet des radiations solaires. Les scientifiques subdivisent l'atmosphère en régions semblables aux stries d'une coquille. La Fig.1 montre quelques unes des espèces chimiques présentes à chaque niveau. Quelques molécules de l'atmosphère (O_2 et O_3) aident à filtrer les radiations ultraviolettes nocives émises par le Soleil.

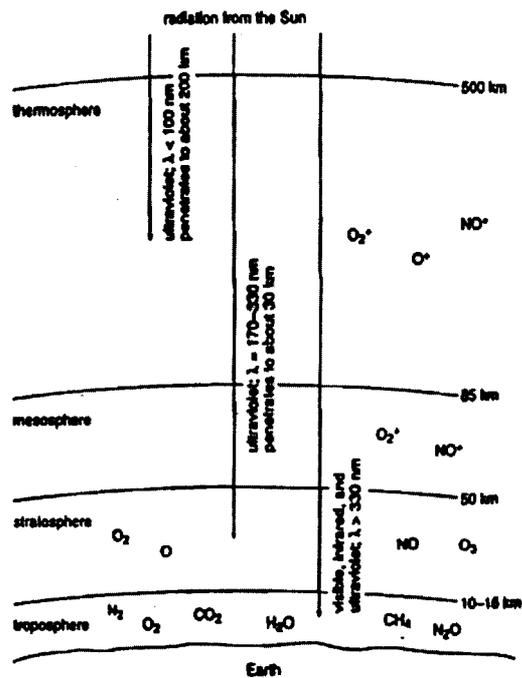


Fig.1 : Une représentation des diverses parties de l'atmosphère et des divers rayons, caractérisés avec leurs longueurs d'onde qui pénètrent à des profondeurs variables. Les différents types de molécules rencontrées à chaque niveau.

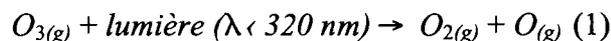
La partie de l'atmosphère qui part du niveau de la mer jusqu'à une altitude de presque 10-16 km s'appelle la troposphère. La troposphère se trouve en contact des espèces vivantes. Toutes les molécules gazeuses requises pour permettre la vie y sont présentes. Les deux composantes majeures (selon le volume) de l'air sec au niveau de la mer sont l'azote (N_2 , 78.08 %) et l'oxygène (O_2 , 20.9 %). Ensuite viennent l'argon (0.94 %), le dioxyde de carbone (CO_2 , 0.035 %). L'eau est normalement le constituant de l'air entre 1% et 3 % (l'intervalle

plein est 0.1-5% en volume). Le pourcentage des gaz nobles varie significativement: Ar, 0.94% ; Ne, 0.0018% ; He, 0.00052% ; Kr, 0.00011% ; Xe, 0.0000087% ; Rn, 0.00000001%.

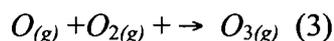
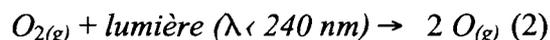
La chimie de l'atmosphère consiste en autant de réactions biologiques et photochimiques qui génèrent et qui détruisent les molécules singulières. Les différentes molécules constitutives de l'atmosphère sont caractérisées par leur temps d'existence moyen assez divers. Les "temps d'existence moyen " pour l'azote, le dioxyde de carbone, le méthane, le dioxyde de soufre, dans la troposphère, sont de 10^6 ans (N_2), 5-6 ans (CO_2), 4-6 ans (CH_4), et 2-3 jours (SO_2).

La stratosphère, qui va du sommet de la troposphère jusqu'à une hauteur de 50 km, contient la couche d'ozone. L'ozone atmosphérique absorbe la lumière ultraviolette émise du Soleil. Si les radiations solaires arrivaient, non filtrées à la superficie de la Terre, les réactions provoquées par les radiations ultraviolettes de haute énergie, pourraient détruire les protéines et les acides nucléiques dans les systèmes vivants. Selon une des théories de l'évolution, la vie ne se serait pas développée sur terre si ce n'y était pas formée cette couche d'ozone protectrice de l'atmosphère.

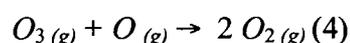
Quand une molécule d'ozone absorbe la lumière ultraviolette, il se passe une réaction de photo dissociation, qui forme l'oxygène moléculaire (O_2) et l'Oxygène atomique (O), comme indiqué suivant la réaction (1) :



Pour maintenir une concentration d'ozone constante dans la stratosphère, il devrait exister un mécanisme efficient de formation de l'ozone. L'ozone se forme à partir d'une réaction photochimique. Le premier pas consiste en la rupture photochimique du lien oxygène-oxygène de l'oxygène moléculaire, sous l'effet de la lumière ultraviolette à haute énergie (équation 2). Les atomes dissociés sont trop réactifs et réagissent avec les molécules d'oxygène pour former l'ozone (équation 3) :

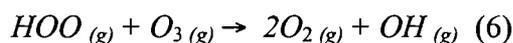
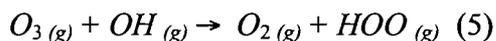


Bien que le mécanisme naturel de formation de l'ozone soit bien connu, les différentes réactions chimiques qui conduisent à sa destruction sont encore en voie d'étude. La réaction remarquable et connue pour détruire l'ozone implique la formation de l'oxygène moléculaire, comme c'est indiqué dans cette réaction (4).



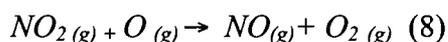
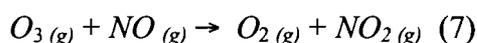
L'ozone réagit avec le radical hydroxyle; le mécanisme de réaction de l'ozone avec le radical hydroxyle dépend de l'altitude. La réaction indiquée là dessous représente le mécanisme d'épuisement de l'ozone par le radical OH qui a lieu à une altitude en deçà de 30 km. Au-delà de 30 km, l'espèce chimique qui réagit avec le HOO dans l'équation (6) et l'oxygène

atomique (O) sans ozone. Cette différence dans le mécanisme est due aux concentrations relatives de O et de O₃, trouvés dans l'atmosphère en fonction de l'altitude.

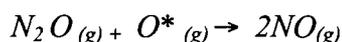


Dans ce processus à deux étapes (équation 5 et 6), deux molécules d'ozone sont converties en trois molécules d'oxygène moléculaire, avec le radical hydroxyle comme catalyseur. Après la destruction d'une molécule d'ozone, le radical OH réactif, reste toujours prêt à poursuivre son rôle de destructeur d'autant plus de molécules possibles d'ozone. De cette façon une petite quantité d'OH serait impliquée dans la destruction d'un grand nombre de molécules d'ozone. Sur la base de diverses recherches scientifiques, maintenant il a été établi que beaucoup de mécanismes catalytiques, seraient responsables de cette destruction de l'ozone. La concentration d'équilibre de l'ozone dans la stratosphère proviendrait de l'équilibre dynamique entre les réactions qui le forment et celles qui la détruisent simultanément. En utilisant les données de terrain et les recherches en laboratoire, les chercheurs sont entrain de développer des modèles qui intéressent le trou de l'ozone et la diminution de la couche d'ozone.

Les oxydes d'azote et les oxydes de chlore sont ainsi impliqués dans la destruction de l'ozone. Les équations (7) et (8) montrent la chaîne de réaction pour l'oxyde d'azote. Identiquement comme le OH, NO décompose catalytiquement l'ozone en oxygène moléculaire.



D'où viennent le OH et le NO? Tous les deux se sont formés naturellement suivant suivant des processus chimiques. L'OH provient principalement des réactions photochimiques de l'O₃, l'O₂ de l'H₂O. La majeure partie du NO provient de la réaction des atomes d'oxygène excités électroniquement (O*) , avec l'oxyde d'azote stratosphérique (NO₂), comme indiqué selon la réaction suivante (9).



Le bioxyde d'azote est un sous produit majeur provenant des processus de nitrification et de dénitrification dans le sol et dans les océans. La Fig.2 montre la perte de la fraction d'ozone due à chaque catalyseur, comme fonction de l'altitude de 30 à 70 km. L'importance relative des atomes d'oxygène, des oxydes d'azote, des oxydes de chlore et des radicaux hydroxyles à des altitudes différentes correspondent aux concentrations relatives des molécules présentes. Dans la partie radiale basse de la stratosphère, des expériences récentes (1994) ont suggéré un rôle croissant pour l'hydroxyle et une diminution du rôle des oxydes d'azote comme décrit dans la figure Fig.2.

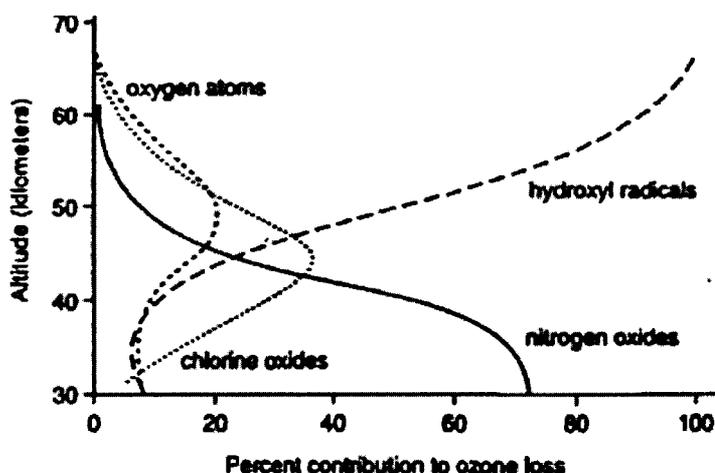


Fig.2 : Les relations entre les distributions des radicaux hydroxyles, oxydes d'azote, oxyde de chlore et les atomes d'oxygène avec le pourcentage de perte d'ozone en fonction de l'altitude en Km (Données de la situation chimique atmosphérique 1985, Organisation Météorologique Mondiale, Genève).

Au dessus de la stratosphère se situent la mésosphère (50-85 km) et la thermosphère (85-500 km). Dans la mésosphère, se déroulent d'importants processus d'ionisation en phase gazeuse. Au-delà de 70 km environ, une portion de la lumière solaire est assez énergétique pour enlever les électrons des molécules et créer des ions. L'ionisation, ainsi provient de la collision entre les molécules dans la mésosphère supérieure et les particules de haute énergie provenant du Soleil. Ces particules, transportées par le vent solaire, entrent dans l'atmosphère supérieure et voyagent à l'intérieure des lignes de force dans le champ magnétique de la Terre. Aussitôt que ces lignes de champ convergent vers les pôles, l'ionisation augmente. La recombinaison des produits ioniques pourrait produire des molécules et des atomes neutres qui passent à des états excités. Ces molécules excitées pourraient relâcher l'excès d'énergie émettant de la lumière. Les lumières du Nord (aurore boréale) sont un exemple du type d'émission de lumière, appelée chimioluminescence.

Les ions dans l'atmosphère supérieure sont utiles dans les communications. La concentration des ions dans la mésosphère est suffisante, pour réfléchir les ondes radios dans une région de la surface de la Terre à une autre. De cette façon, les ondes courtes de radio transmission, pourraient voyager autour du monde. Quelques fréquences de radio, comme les FM, ne sont pas réfléchies efficacement ; ceci limite leur parcours de transmission d'une certaine manière.

1.1 La photochimie du chlorofluorocarbone et le trou d'ozone

Le développement des chlorofluorocarbones (CFC) est une des découvertes technologiques majeures de la chimie organique. Ces gaz (ainsi appelés Fréon), deviennent rapidement des liquides sous pression ; comme liquides sont utilisés dans les compresseurs d'air conditionné et des réfrigérateurs. Avant 1992, les compresseurs des réfrigérateurs fonctionnaient avec l'ammoniaque comme fluide de travail. Ces CFC sont moins toxiques et de manipulation plus facile et sûrs pour les applications des consommateurs. Autant de solvants commerciaux,

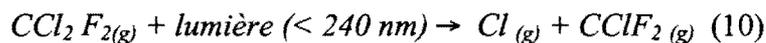
pour nettoyer les composants électroniques (computer chip), sont ainsi faits de CFC. Et jusqu'à 1970, ces CFC sont amplement utilisés comme propulseurs.

La production mondiale des CFC avoisine la moitié du million de tonnes par an. Maintenant ces molécules font partie des composantes homogènes de l'atmosphère globale ; il y a autant de centaines de molécules de CFC, pour chaque trillion de molécules de l'air.

Ces CFC sont des molécules extrêmement inertes; probablement ne font pas provoquer les réactions chimiques dans la troposphère.

Les CFC sont des molécules extrêmement inertes ; probablement ne font pas survenir les réactions chimiques dans la troposphère. Il a été pensé qu'à cause de leur inertie chimique, ces molécules n'endommageraient pas l'environnement. Mais ces CFC ne sont pas inertes photo chimiquement ; l'excitation avec la lumière ultraviolette de courte longueur d'onde rompt le lien carbone-chlore (équation 10).

De cette réaction, se forme le chlore atomique et ensuite l'oxyde de chlore qui conduirait à la destruction de l'ozone, avec des mécanismes analogues.



2. Interaction Ozone-Plante

2.1 La formation de l'ozone troposphérique

Dans la troposphère, la majeure partie de l'O₃ provient de la photolyse du NO₂, qui produit l'oxygène monoatomique (O), (qui ensuite forme l'O₃ réagissant avec l'O₂). Les aldéhydes, les hydrocarbures (HC) et le CO accélèrent cette photolyse initiale, augmentant la vitesse de formation du NO des radicaux peroxydes (RO₂) et au même moment, produisant des radicaux hydroxyles HO hautement réactifs. Les interrelations variées entre les oxydes d'azote et l'O₃ sont résumées dans (Capa *et al.* 1994).

L'évaporation des solvants et la combustion incomplète des combustibles dégagent une grande quantité des HC dans l'atmosphère. Puisque la majeure partie des HC dans l'atmosphère provient des gaz à effet de serre ; le méthane (CH₄) provient aussi de la végétation en décomposition, comme d'origine soit industrielle que domestique. Des mécanismes photolytiques conduisent à l'oxydation complète du CH₄ en CO₂ comme dans la dégradation des autres HC (voir Wellburn 1988).

2.2 Les mécanismes du dommage dans les plantes

Aucune double liaison dans les HC n'est hautement sensiblement aux réactions de chain breaking et de cross-linking initiées par l'O₃. Les réactions de chain cutting donnent toujours des radicaux RO₂ qui ensuite vont générer des radicaux libres. D'autant plus que, la majeure partie des composantes des tissus biologiques se trouve dans un environnement gazeux. Ce fait change les caractéristiques d'attaque de l'ozone aux liaisons non saturées dans les

composantes du carbone. Au lieu de former des radicaux libres et des ozonurides secondaires, se forment les composés hydratés de l' O_3 , qui donnent des peroxydes (H_2O_2), des hydroxyhydroperoxydes (HHP) et des aldéhydes réactifs selon le processus d'ozonolyse. Si le composant sous l'influence de l' O_3 avait plus d'une double liaison (par exemple les acides gras des lipides), dès lors on aurait la formation de malonedialdéhyde ($OHC.CH_2CHO$). Le même composant pourrait aussi être produit par les substrats semblables, à travers une série de différentes réactions comme la lipopéroxydation. Selon certains, l'ozonolyse et la lipopéroxydation sont synonymes, mais de fait elles relèveraient de processus distincts (Mudd, 1982). La première crée du H_2O_2 et n'est pas le produit de la conjugaison des doubles liaisons (par exemple produit des liaisons C-C double et simple alternative ; dans la phase aqueuse les radicaux libres n'y sont pas impliqués. La lipopéroxydation, d'autre part conduit à des produits conjugués (ainsi alternent les liaisons simples avec les liaisons doubles) et nécessite une attaque initiale de la part des radicaux libres, plutôt que de l' O_3 et il ne forme pas de H_2O_2 .

Il résulte, cependant nécessaire de déterminer quelle série de réaction et quelles espèces réactives sont effectivement responsables de l'attaque des protéines ou des lipides des membranes biologiques. La production de malonedialdéhydes n'est pas une preuve d'un processus particulier, parce que c'est produit dans les deux mécanismes. Ainsi à travers des expériences de traitement de matériel biologique avec O_3 , il se produit des radicaux libres provenant de la lipopéroxydation ; non habituellement dans le matériel biologique à la température ambiante, se forme le H_2O_2 de l'ozonolyse. L'ozone, produit même des radicaux $OH\cdot$ dans des solutions alcalines ou réagit avec le H_2O_2 , mais seulement dans des systèmes vivants, néanmoins ce H_2O_2 est déplacé par catalyse (Heath 1987).

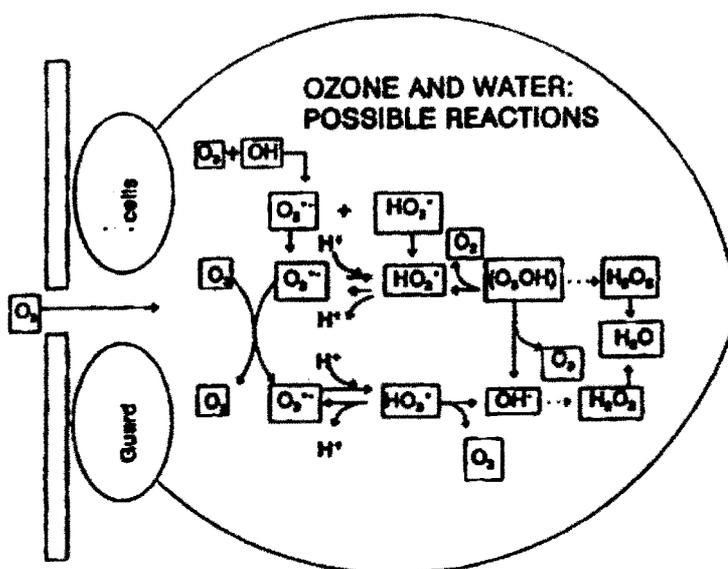


Fig.4 : Réaction possible de l'ozone quand il entre dans l'espace intracellulaire, où il est hautement réactif et la réaction de dissolution de l'eau.

Trois acides aminés (cystéine, méthionine et tryptophane) sont sensibles à l'attaque d' O_3 , aussi bien dans les solutions aqueuses que dans les tissus biologiques. Les groupes sulfhydriques des deux premiers amino acides sont oxydés en ponts disulfure et en oxyde de

soufre, alors que le noyau pyrrolique du tryptophane est ouvert pour former le N-formyl-kinurénine. Cependant, si l'O₃ réagit avec les mêmes acides aminés qui font partie des protéines fondamentales pour le métabolisme, il y aurait des conséquences extrêmement importantes pour la cellule (Mudd 1982). De tel dysfonctionnement deviendrait spécialement dommageable, d'autant plus qu'il y aurait altération des formes secondaire et tertiaire de protéine. Les changements de l'orientation spatiale des amino acides des protéines deviennent critiques, si par exemple ils font partie du centre de réaction de l'enzyme. Certainement quelques enzymes ont montré une preuve claire de ce type d'attaque. Dans les plantes, les protéines plus vraisemblablement exposées à l'attaque à l'O₃, celles qui sont partiellement situées dans la membrane cellulaire. En effet, ces protéines montrent toujours des changements relevant de l'ozone, bien avant les lipides situés à l'intérieur de la membrane inférieure. Ces changements dans les membranes dérivant de l'attaque des protéines ou des lipides, induisent des modifications dans la perméabilité des cellules, etc. (Heath 1987).

La réduction univalente de l'oxygène moléculaire produit des radicaux supéroxydes (O₂^{•-}) et des OH[•], H₂O₂, et H₂O et quelque peu O₃. Le O₂^{•-} et le H₂O₂ ne sont pas suffisamment réactifs dans les solutions aqueuses pour initier la lipopéroxydation, mais le radical peroxydril (HO₂[•]) le pourrait par contre. Le pKa d'équilibre entre le O₂^{•-} et le OH est de 4.8., qui signifie que dans une solution tampon (à pH autour 7), dans un environnement physiologique, existent seulement peu de radicaux HO₂[•]. Dans les vacuoles cellulaires, cependant où les niveaux d'acidité sont élevés, leur formation est plus probable.

Dans les milieux aqueux, O₂^{•-} est relativement non réactif, mais une fois à l'intérieur, dans les régions hydrophobes du côté des chaînes d'acides gras à l'intérieur des membranes, se transforme en oxyde capable de changer l'α-tocophérol et de déplacer le mécanisme le plus anti oxydant opérant dans la cellule. Les radicaux O₂^{•-} et HO₂[•], encore pourraient être convertis, à travers les radicaux H₂O₂ aux radicaux OH, qui ensuite réagiront vraisemblablement avec les molécules biologiques immédiatement. Ceci signifie que ces molécules ne diffusent pas avant de réagir (Heath 1988).

Ainsi que d'autres mécanismes libèrent aussi le H₂O₂, parmi lesquels font partie les mécanismes de défense anti oxydants des tissus biologiques. Quelques uns sont spécifiques pour certaines espèces, les autres se déroulent dans tous les organismes aérobies. Parmi lesquels y sont soit les intermédiaires du cycle des xanthophylles, soit le glutathion réduit à l'ascorbate, qui nettoient les radicaux libres solubles dans l'eau, soit un cycle similaire basé sur l'α-tocophérol, pour ceux qui se trouvent en phase non aqueuse (Alscher & Cuming 1990).

2.3 L'entrée de l'ozone dans les plantes

La pénétration de l'O₃ dans les feuilles des plantes survient à travers les stomates, qui sont des ouvertures. La majeure partie des plantes ont leurs stomates ouverts durant la journée, par conséquent le dommage dû à l'O₃, commence avec la lumière. Le cactus et les autres plantes qui ont leurs stomates ouverts, seulement durant la nuit, pour économiser les pertes d'eau

durant la journée, ont leur sensibilité maximum à l'O₃, durant les périodes d'obscurité (Heath 1980).

Les réponses à l'O₃, sont déterminées par une large variabilité de facteurs environnementaux et génétiques. Les superficies humides à l'intérieur des feuilles (par ex. le fluide extracellulaire des tissus du mésophylle) permettent à l'O₃, de se dissoudre et de diffuser suivant un gradient de concentration similaire à celle du CO₂. La solubilité, la rapidité de décomposition et la valeur du pH des différents moyens, influencent la quantité d'O₃ prélevé. L'O₃ a approximativement une solubilité de 1/3 respectivement à celle du CO₂, par contre 100 fois inférieure à celle du SO₂ (Heath 1984).

2.4 Les changements cellulaires et les dommages

Une fois, à l'intérieur de la superficie des feuilles et à côté du fluide extra cellulaire, l'O₃ réagit et forme immédiatement les autres dérivés, qui montrent des niveaux de réactivité variable. En effet, il est probable que la majeure partie de l'O₃ non réactif passe à travers la cellule. Des études à Lancaster, Essen et les autres ont montré que l'O₃ réagit avec les HC : une partie de ces HC sont émis par les cellules sous jacentes, pour former des ozonurides primaires et de hydro peroxydes (HHP). Ce sont ces HHP qui seraient responsables de certains effets nocifs de l'O₃ qui se dérouleront avant que les systèmes naturels anti oxydants à l'intérieur des cellules puissent s'activer (Mehlhorn *et al.* 1991). Des augmentations de la biosynthèse de la phytohormone l'éthylène, ont été enregistrées répétitivement dans des expériences d'air purifié, où les plantes ont été mises à y pousser et ont été exposées à des concentrations élevées d'O₃ (par ex. Craker 1971 ; Tingey *et al.* 1976c ; Mehlhorn & Welburn 1987 ; Mehlhorn *et al.* 1988, 1991, 1994 ; Langebartels *et al.* 1991) ; la formation de l'éthylène dû au stress sur les plantes, est un bon indicateur de stress dû à l'O₃ (Tingey *et al.* 1976 c). De plus, l'inhibition de la formation de l'éthylène dû au stress sur les plantes exposées en continu à l'O₃, provoque moins de dommage foliaire et réduit la toxicité de l'O₃ (Mehlhorn & Welburn 1987 ; Mehlhorn *et al.* 1991). Cette hypothèse a été vérifiée à travers l'observation que le prétraitement des plantes exposées à l'éthylène diurea (EDU), un protecteur chimique contre l'O₃, empêcherait la formation de l'éthylène du stress dans les plantes exposées à l'O₃ (Zinlinkas *et al.* 1990). Les différences dans la sensibilité des deux variétés de tabac Bel B et Bel W3, pourraient être expliquées avec les différences dans la rapidité de formation de l'éthylène (Mehlhorn *et al.* 1991 ; Langebartels *et al.* 1991). Il y a différentes possibilités d'interprétation de comment l'éthylène de stress se forme, qui déterminent la sensibilité des plantes à l'ozone :

1. l'aminovinylglycine (AVG) pourrait agir comme un nettoyeur pour l'ozone ;
2. l'éthylène induit la fermeture des stomates pour réduire le prélèvement de l'ozone ;
3. l'éthylène renforce les processus de sénescence ;
4. l'éthylène régule les réactions de défense qui empêchent la toxicité de l'ozone ;
5. les réactions de l'éthylène avec l'ozone initient la formation des radicaux libres qui provoquent le dommage dans les tissus ;
6. l'éthylène régule la synthèse des substances chimiques, qui pourraient réagir avec l'ozone et, de cette manière, induire la formation des radicaux libres.

Cette possibilité a été étudiée par différents groupes. Il a été cependant mis en évidence que l'AVG n'assurait pas le rôle de balayeur de radicaux (Chameides 1988 ; Zilinkas *et al.* 1990 ; Mehlhorn *et al.* 1990, 1991), cependant les effets de l'éthylène ou de l'O₃ dans la sénescence se différencient dans les différentes voies (Pauls & Tompson 1981 ; Tingey *et al.* 1976a).

Des enzymes comme l'ascorbate peroxydase (Mehlorn 1990) et le glutathion réductase (Mehlorn 1990, non publié), pourraient être régulées par l'éthylène et paraîtraient impliquées dans la détoxification des HPP, qui se seraient formés quand les plantes se trouvant exposées à l'O₃ (Mehlhorn 1990; Hewitt *et al.* 1990). Cependant, ces fonctions de l'éthylène et de l'O₃, opèrent seulement si des niveaux croissants des enzymes anti oxydants agissaient avant l'exposition des plantes aux concentrations dommageables de l'O₃.

Comme l'ont montré (Grimes *et al.* 1993) et (Mehlorn *et al.* 1994), des réactions entre l'éthylène et l'O₃, se forme un groupe de radicaux libres, cependant que s'accumule le formaldéhyde, le formiate et l'acide acétique dans les tissus endommagés par l'O₃ (Mader *et al.* 1995 ; John *et al.* 1993 ; Mehlorn *et al.* 1994). De surcroît l'accumulation du formiate et de l'acide acétique dépend de la rapidité de la formation de l'éthylène du stress et est inhibé si la biosynthèse de l'éthylène venait à être bloquée avec le traitement de l'AVG (John *et al.* 1994; Mehlhorn *et al.* 1994). Il pourrait y avoir deux possibilités de formation de l'acide acétique ; la formation de l'acide acétique serait une preuve de la réaction de l'O₃ avec l'isoprène (Salter & Hewitt 1992), ou bien de la réaction de l'O₃ avec les résidus phényle propénoïques de la lignine (Tingey *et al.* 1976 b). Pourtant, moins de formiate s'accumulerait dans les plantes exposées à l'O₃, respectivement à (John *et al.* 1986) ; des quantités plus importantes d'acide acétique se formeraient durant la dégradation de la lignine à travers l'O₃ (Haluk *et al.* 1986), dès lors il apparaît que la réaction de l'O₃ avec l'isoprène prédomine. En plus, des taux assez élevés d'acide acétique formés dans les plantes exposées à l'O₃ signifient que l'oxydation de l'isoprène sous l'action de l'O₃, contribuerait plus à la formation des radicaux libres, qu'à la réaction de l'O₃ avec l'éthylène (John *et al.* 1994). Ces observations ont été corrélées avec la découverte de (Hewitt *et al.* 1990), qui a déjà trouvé des effets de l'O₃ sous l'émission des taux d'isoprène et l'augmentation de la formation de l'acétaldéhyde dans les plantes exposées à l'O₃ (Kimmerer & Kozlowski 1982).

En résumé, l'inhibition de la formation du formiate et de l'acide acétique de la part de l'AVG dans les plantes exposées à l'O₃, fournit une vraie preuve concernant l'hypothèse de la formation de l'éthylène du stress déterminant la sensibilité des plantes à l'O₃, à travers la formation des radicaux libres. En plus, les résultats provenant de (John *et al.* 1994), aussi peuvent signifier que la formation des radicaux libres de la lignine pourrait être importante durant la toxicité de l'O₃; éventuellement, parce que l'éthylène régule aussi la formation de l'isoprène et de la lignine.

Comme, il a été établi, la majeure partie des études, conduit au dommage de l'O₃ ayant montré que le cytoplasme et la membrane cellulaire des plantes, souffrent de plus au dommage. Ceci se caractérise à travers les changements dans la perméabilité et la présence de fissures au niveau des membranes cellulaires, aux importants cations comme le potassium. La membrane interne (par. Ex. les feuillettes des organites), sont moins influencés comme les

toxiques oxydants, dérivant de l'O₃ sont dilués et absorbés de l'extérieur vers l'intérieur (Heath 1987).

Cependant qu'il y a la preuve de réparation cellulaire, les sites du dommage sont non spécifiques. Un dommage pesant causé par des oxydants provenant de l'O₃ est annoncé avec des pertes de chlorophylle, augmentant la fluorescence (indicateur de la perte d'énergie lumineuse), et des changements des niveaux de l'adénylate (ATP, etc.). Des perturbations plus sensibles dans les cellules des plantes dues à l'O₃, ont montré des changements dans les flux des composantes variées à travers les membranes, spécialement celles des sucres, des acides aminés, de l'eau et des ions de potassium. La perturbation du transport à travers la membrane pourrait être liée à la défaillance du contrôle de la pression osmotique et du maintien des effets électropotentiels à travers la membrane. Seulement, quand les niveaux d'O₃ sont bas ou surtout, durant une brève exposition à l'O₃, il demeure possible la capacité de transport normal.

Le dommage visible, induit par les HHP, etc., provient de l'incapacité de réparer ou de compenser la perméabilité des membranes altérées. Initialement confinée dans les cellules, l'agression s'étend et se transforme en dommage pathologique et irréversible, caractérisé par le blanchiment des cellules. Des premiers symptômes de dommage apparaissent comme des aires immergées dans l'eau juste sous l'épiderme. Si la réversibilité est encore possible, ces régions reluisantes immergées dans l'eau, disparaissent au fur et à mesure, comme les tissus retrouvant ainsi le contrôle de leur perméabilité. Le dommage visible est normalement confiné dans le feuillage ; mais les facteurs génétiques et environnementaux d'une ample variabilité, influencent de par leur nature. Le type habituel de dommage et les marques chlorotiques ou les points sur les feuilles à travers les veines, plutôt le dommage varie entre espèces. Plus tard, de tels dommages pourraient devenir rosâtres ou bronzes, dûs à la production intense d'anthocyanine, relevant de la formation des tanins (Treshow, 1984).

3. Le système de défense des plantes

3.1 Le dommage dû à l'ozone

L'ozone est le type de pollution de l'air le plus diffus dans plusieurs aires du monde industrialisé (Krupa & Manning 1988). Les concentrations environnementales de l'ozone en Europe sont généralement en dessous du seuil qui cause des dommages visibles, mais des changements invisibles peuvent se vérifier dans les plantes altérant ainsi la productivité des récoltes (Reich & Amudon 1985). Récemment, les concentrations d'ozone dans les strates basses de l'atmosphère en Europe sont allées en augmentant (Penkett 1984) ; des épisodes limités de pics d'ozone capables de causer des dommages directs dans les plantes sensibles ont été évoquées dans la littérature (Myhre & *al.* 1990, Derwent 1990). Il a été établi que les brèves épisodes de concentration élevée d'ozone sont très dommageables pour les plantes que les longues périodes d'exposition à des basses concentrations (Kohut *et al.* 1987 ; Mehlhorn ; O'Shea & Wellburn 1991). Par conséquent, l'ozone apparait nuire à la santé des plantes de deux manières : une faible dose pour un long moment, endommagement principalement les

processus physiologiques et le métabolisme sans causer des dommages visibles (Darall 1989), par contre des périodes brèves de dose élevée provoquent des dommages visibles. Tous ces deux processus d'attaque de l'ozone réduisent la photosynthèse nette et pourraient ainsi précipiter la sénescence (Pell & Dann 1991; Paakkonen *et al.* 1993) et de cette façon conduit à la diminution des récoltes (Dann & Pell 1989).

L'ozone entre dans les feuilles à travers les stomates. L'entrée des gaz semble dépendre du nombre et des dimensions des stomates, ainsi que de leurs degrés d'ouverture (Rich, Wagoner & Tomlinson 1970). Dans les conditions d'humidité élevée, l'ouverture stomatique augmente et les plantes sont habituellement plus sensibles à la pollution de l'air (Mc Laughin & Taylor 1981). L'application exogène de la phytohormone, l'acide abscissique (ABA) réduit le dommage dû à l'ozone dans les plantes (Adepipe & Ormrod 1972), suggérant que ABA pourrait être impliqué indirectement dans la résistance à l'ozone des plantes à travers la modification de la fonction stomatique (Downton, Loveys & Grant 1988).

Il a été prouvé que, une fois que l'ozone entre dans les feuilles, les radicaux produits par l' O_3 , (Lee 1968) peuvent altérer l'intégrité des cellules. Ainsi que l' O_3 , réagit vraisemblablement, avec les composantes des parois cellulaires et avec les membranes plasmiques, pour former les espèces réduites par l'oxygène (ROS), comme les radicaux super oxydes (O_2^-), les radicaux oxhydryles (OH^{\cdot}) et les peroxydes d'hydrogène (Fig.5).

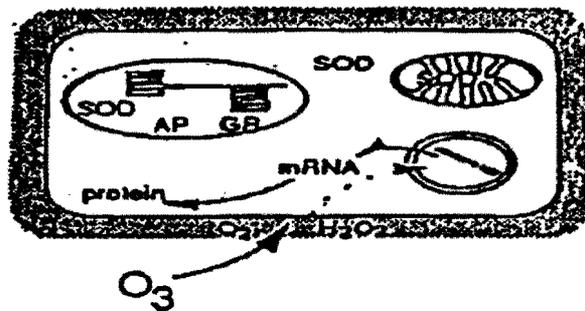


Figure 5. La localisation des formations du radical oxygène conduisant à l'activation du gène et à la synthèse des protéines dans une cellule de plante exposée à l'ozone. L'ozone réagit avec les structures apoplastiques formant des espèces d'oxygène actif et le peroxyde d'hydrogène. Les lignes à trait tiré représentent le signal de la chaîne de transduction qui porte l'information provenant de la formation des radicaux libres apoplastiques vers le noyau, résultant de l'activation du gène et de la synthèse des protéines. Est indiquée la compartimentalisation subcellulaire des enzymes détoxifiants de l'oxygène actif, tel que la Supéroxyde dismutase (SOD), l'Ascorbate peroxydase (AP), et le Glutathion réductase (GR), qui sont souvent responsables de l'élimination des radicaux libres dérivés de l'ozone.

Récemment, Mehlhorn, Tabner & Wellburn (1990) ont démontré la formation de ces radicaux libres dans les plantes exposées à l'ozone avant l'apparition des symptômes macroscopiques, utilisant la spectroscopie de résonance du spin électronique. Il a été démontré que la concentration d' O_3 dans l'espace intracellulaire des feuilles est voisine de zéro, ainsi que la concentration d' O_3 en dehors de la feuille est élevée (Laisk, Kull & Moldau 1989). L'exposition à l'ozone altère la perméabilité de la membrane plasmique; des altérations dans le schéma des lipides dans les plantes ont été aussi mises en évidence (Heath 1987). Les ATPases, qui sont associées à la pompe ionique dans les membranes, peuvent être inactivées par l'ozone (Dominy & Heath 1985). Tous ces changements peuvent conduire à la perturbation du métabolisme normal de la "machinerie cellulaire".

Un des effets subits, observés dans les plantes exposées à l'ozone est une réduction de la photosynthèse nette (Reich & Amudson 1985). Par exemple dans la patate, exposée à une dose relativement basse à l'ozone (par exemple 60-80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, durant 4 jours), l' on observe une diminution de la photosynthèse, qui retourne au niveau des contrôles après l'exposition (Dann & Pell 1989). La fumigation de l'avoine avec 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per durant 2 heures provoque une diminution de la photosynthèse dans les feuilles plus âgées (Myhre *et al.* 1988). La diminution de la photosynthèse est souvent corrélée à la décroissance de la quantité de chlorophylle et de la quantité et de l'activité de la protéine Rubisco (Lehnerr *et al.* 1988 ; Dann & et Pell 1989 ; Nie, Tomasevic & Baker 1993), mais on n'observe aucun changement dans le système du transport électronique et photochimique (Sen Gupta, Alscher & McCune 1991; Aarnes *et al.* 1993) ou de la composition des protéines thylacoïdales (Nie *et al.* 1993) . L'exposition à l'ozone a provoqué la décroissance de la transcription des gènes de la petite sous unité Rubisco dans la patate (Nie Reddie *et al.* 1993), qui pourrait conduire à la diminution des niveaux de la protéine Rubisco.

Rubisco joue un rôle double dans le dommage dû à l'ozone. C'est une enzyme clé dans la fixation du dioxyde de carbone durant la photosynthèse et aussi une protéine majeure de la feuille, qui est impliquée dans les processus de sénescence prématurée (Dann & Pell 1989 ; Pell, Eckardt & Eyendi 1992). Les données accumulées jusqu'à présent ont suggéré que l'ozone directement réduit la croissance de la plante et la photosynthèse (Darral 1980). A des concentrations basses d'ozone, une grande proportion de l'assimilé est habituellement localisée dans les feuilles et les troncs à décapiter des racines et des couronnes (Hech *et al.* 1983). Dans les plantes pérennes, l'effet de l'ozone probablement réduit l'énergie de réserve dans les racines, elle qui pourrait avoir des implications importantes dans la survivance hivernale et dans le réveil printanier, quand l'énergie de réserve vient à être utilisé (Cooley & Manning 1987). De cette façon la pollution de l'ozone peut influencer indirectement la productivité de la plante, faisant diminuer la tolérance des plantes au stress environnemental.

L'ozone induit des changements dans le métabolisme des plantes et dans la machinerie biochimique, qui ont été étudiés durant un long moment. Cependant, malgré la large diffusion des dommages dûs à l'ozone, les mécanismes précis des processus de dommages et des systèmes de défense de la plante contre l'attaque de l'ozone, sont encore mal compris. Les effets des dommages dûs à l'ozone sont perçus à travers l'analyse des changements dans le métabolisme primaire et de la fixation du carbone.

La résistance des plantes à l'ozone est liée à la régulation de sa pénétration à travers les stomates. Quoi que beaucoup d'articles récents indiquent une induction rapide des itinéraires biochimiques variés en réponse à l'exposition à l'ozone, et des différences contradictoires entre les souches des plantes sensibles et résistantes ont été décrites.

4. L'induction des systèmes de défense de la plante de la part de l'ozone

4.1 La synthèse de l'éthylène en réponse au stress dû à l'ozone

Il a été suggéré que la capacité inhérente des plantes à synthétiser l'éthylène du stress dû à l'ozone en réponse à l'exposition (Castillo, Miller & Greppin 1987; Mehlhorn & Wellburn 1987; Taylor, Ross-Todd & Gunderson 1988; Langebartels *et al.* 1991; Mehlhorn *et al.* 1991; Telewski 1992), pourrait être un facteur déterminant dans la sensibilité à l'ozone Mehlhorn et Wellburn 1987 ; Mehlhorn *et al.* 1991). Quand l'éthylène réagit avec l'ozone, il se produit, de façon présumable des oxyradicaux libres hautement réactifs solubles dans l'eau, qui peuvent endommager les plantes (Nello & Wellburn 1987; Mehlhorn *et al.* 1990). L'inhibition de la synthèse de l'éthylène dû au stress à l'ozone, minimise le dommage dans les plantes et l'exposition à l'éthylène, avant fumigation à l'ozone ainsi réduit les dommages de l'ozone dans le pin et le haricot (Mehlhorn 1990). Des preuves limitées ont été rapportées (Mehlhorn & Wellburn 1987; Mehlhorn *et al.* 1991), que le traitement à l'éthylène avant l'exposition probablement induit les systèmes de défense, comme par exemple l'induction de l'activité des peroxydases, qui protège les plantes contre les effets nocifs de l'ozone et les oxy radicaux produits dans les réactions chimiques de l'ozone avec l'éthylène ou des autres produits des plantes.

La possibilité que l'éthylène joue un rôle dans la détermination de la sensibilité des plantes à l'ozone a été fortement supportée par les études sur la synthèse de l'éthylène et des polyamines dans les variétés de tabac ozone-sensible des plantes et ozone-résistant, respectivement Bel W3 et Bel B (Langebartels *et al.* 1991). La synthèse de l'éthylène augmente considérablement après l'exposition à l'ozone du tabac sensible Bel W3, pendant que la synthèse de l'éthylène reste basse dans le tabac insensible Bel B. Dans Bel W3, augmentent, soit la concentration du précurseur de l'éthylène ACC, que le développement de l'éthylène qui a lieu aussitôt (1-2 h après l'exposition à l'ozone) ; ces accroissements viennent à être corrélés avec le dommage des feuilles du tabac ozone sensible Bel W3).

La synthèse de l'éthylène à partir de la méthionine Figure.6 est régulée au niveau des gènes comme l'ACC Synthétase (Kende 1993). L'utilisation des sondes des gènes de l'ACC synthétase a montré une rapide activation des gènes de la transcription suivant l'introduction du facteur de stress ; plusieurs transcrits régulés différentiels de l'ACC synthétase ont été retrouvés dans la tomate (Yip, Moore & Yang 1992), dans *Arabidopsis* (Liang *et al.* 1991) et dans les aubergines (Huan *et al.* 1991), indiquant que qu'il y a autant d'isoenzymes de l'ACC synthétase. Ces iso enzymes peuvent être distribués et activés séparément en réponse par exemple à l'auxine et suite à la blessure (Huan *et al.* 1991); Yip *et al.* 1992) et durant le développement de la plante (Rottman *et al.* 1991 ; Park, Drory & Woodson 1992). Un article préliminaire (Schlaghauser, Arteca & Pell 1993) sur les réactions induites par l'ozone dans la patate, indiquant une forte croissance de transcription des gènes de l'ACC Synthétase en réponse à l'exposition à l'ozone. Avec des sondes spécifiques des gènes qui codifient les

différents iso enzymes de l'ACC synthétase, serait possible de déterminer quels gènes ont été induits par l'ozone. Ceci aurait donné plus d'informations à propos du mode d'action du dommage dû à l'ozone, quand ça arrive dans les plantes.

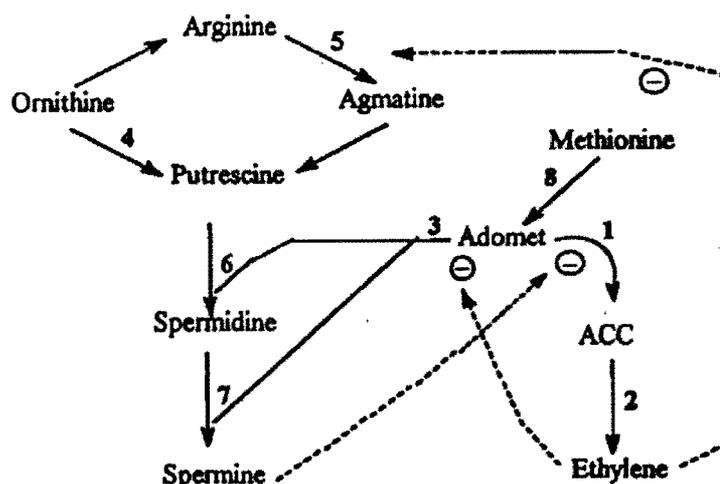


Figure.6 : Biosynthèse de l'éthylène et des polyamines dans les plantes. En traits discontinus, sont indiquées les interactions des inhibiteurs (-) des voies métaboliques. L'ozone est connu d'induire la synthèse de l'éthylène, la transcription du gène de l'ACC Synthétase, les changements des concentrations des polyamines et l'induction de l'activité de l'ADC.

5. Induction de la synthèse des polyamines en réponse à l'ozone

Outre la formation de l'éthylène, existe le pathway des polyamines qui a le même intermédiaire, AdoMet Fig.6, du pathway de l'éthylène. Un tel pathway semblerait aussi impliqué dans la détermination de la sensibilité des plantes à l'ozone (Rowland-Bamford *et al.*1989, Langebartels *et al.*1991). Les effets de l'ozone sur l'activité sur l'arginine décarboxylase (ADC), l'enzyme clé de la synthèse des polyamines du stress dans les plantes (Apelbaum, Goldfust & Icekson 1985 ; Evans & Malmberg 1990), ont été étudiés dans le blé (Rowland-Bamford *et al.*1989), dans la patate (Nagy Reddy *et al.* 1993) et dans le tabac Langebartels *et al.*1993). Il y a une forte corrélation positive entre l'exposition à l'ozone et l'induction de l'activité de l'ADC, dans le tabac et le blé et l'augmentation du contenu des polyamines dans les plantes ; la spermidine dans le blé et la putrescine dans le tabac Bel B résistant. Dans les feuilles de blé, l'accumulation des polyamines est corrélée avec la putrescine contre le dommage dû à l'ozone, parce que l'application dans les feuilles de difluoro méthyle arginine (DFMA), un inhibiteur spécifique, augmente les dommages après la fumigation à l'ozone (Rowland-Bamford *et al.*1989). En plus de l'augmentation de l'activité de l'ADC, l'ozone et les polluants de l'air ont été impliqués de faire décroître l'activité extracellulaire des diamines oxydases dans les haricots (Peters, Castillo & Heath 1989), circonstance qui peut aussi expliquer les augmentations observées des niveaux de spermidine et de putrescine.

5.1 Le rôle des polyamines comme nettoyeurs des radicaux

Il a été établi qu'après l'exposition à l'ozone, devient changée la perméabilité de la membrane plasmique (Heath 1987), un tel fait pourrait être finalement attribué à la lipopéroxydation des lipides (Chevrier, Chung & Sarhan 1990). Les polyamines peuvent jouer un rôle indirect, formant des chélates avec les ions métalliques qui catalysent la lipopéroxydation (Bors *et al.* 1989). Le rajout de la putrescine et de la spermidine exogène au tabac sensible Bel W3, avant le traitement à l'ozone, augmentant la quantité de polyamines libérés et conjugués dans les feuilles, et une réduction des dommages visibles dûs à l'ozone est évidente (Bors *et al.* 1989). Les polyamines peuvent agir comme agents stabilisateurs des membranes et nettoyeurs de radicaux oxygène (Evans & Malmberg 1989 ; Rowland-Bamford *et al.* 1989), bien qu'il a été montré que les effets des polyamines comme nettoyeurs de oxyradicaux soit dû à la conjugaison du groupe hydroxy phénolique et ne dépend pas de la même amine (Bors *et al.* 1989). Dans le tabac, les polyamines sont complètement conjuguées avec les acides hydroxy cinnamiques (Bors *et al.* 1989), et dans le tabac exposé à l'ozone, la putrescine accumulée est conjuguée avec l'acide amino-idroxcinnamique (Langebartels *et al.* 1991). Un des mécanismes pour empêcher le dommage dû à l'ozone avec les polyamines est la répression Fig.7 de la formation de l'éthylène des polyamines (Langebartels *et al.* 1991). Des niveaux élevés de polyamines sont connus de faire décroître les activités de l'ACC Synthétase et de l'ACC oxydase (Apelbaum 1990) et peuvent de cette manière réduire la formation de l'éthylène, autrement induit par l'ozone.

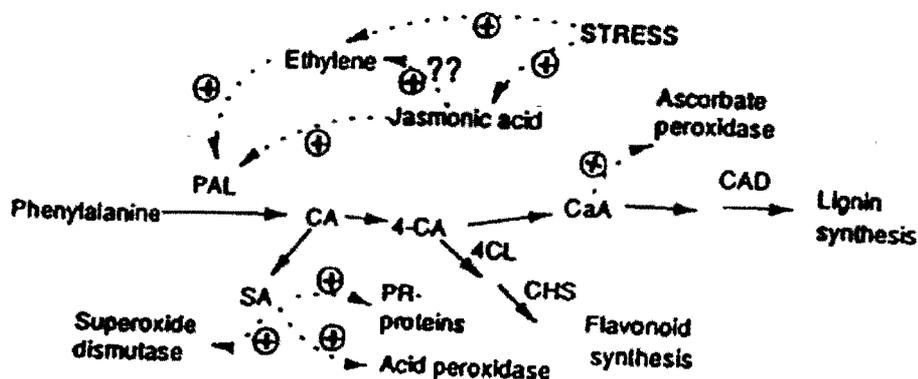


Figure 7: L'induction du stress du métabolisme des phényles propanoïdes dans les plantes et l'induction des différentes réactions de défense de quelques substances phényles propanoïdes. Les lignes en traits discontinus indiquent l'induction de l'activité enzymatique ou de l'expression du gène. Les abréviations utilisées: CA=Acide Cinnamique; 4-CA=Acido trans Cumarilique; CaA= Acido Caféique; SA=Acido Salicilique; CHS=Calcone Synthétase; PAL=Phényl Alanine Ammoniaque Lyase; CAD=Cinamyl Alcoool Déhydrogénase; 4CL=p-cumarate:CoA Ligase.

Dans les cultivars tabac ozone-résistant et sensible (respectivement Bel B et Bel W3), l'induction différentielle des voies métaboliques des polyamines et de l'éthylène est visible (Langebartels *et al.* 1991). Dans le tabac ozone-résistant Bel B, l'activité de l'ADC et les niveaux de polyamines libres et conjugués croissent très rapidement après l'exposition à l'ozone, cependant la synthèse de l'éthylène de stress reste faible. Les polyamines sont reconnus être impliqués dans la transcription du niveau de l'ACC Synthétase (Li *et al.* 1992);

la putrescine, la spermidine et la spermine exogène font décroître le niveau de RNAm d'un transcrit de l'ACC Synthétase de la tomate, mais l'inhibition est transitoire en nature.

5.2 L'induction des pathways du phényle propanoïde et des flavonoïdes au stress d'ozone

Il a été établi que le traitement avec l'ozone provoque l'augmentation de l'activité des enzymes Phénylalanines Ammoniaques Lyases (PAL) (Roseman, Heller & Sanderman 1991, Eckey Kaltenbach *et al.* 1994), Calcone Synthétase (CHS) (Keen et Taylor 1975 ; Rosemann et al. 1991) et Cinnamil Alcool Déshydrogénase (CAD) (Galiano *et al.* 1993a), des enzymes qui contrôlent respectivement les pathways de la biosynthèse des phényles propanoïdes, des flavonoïdes et de la lignine. Ces pathways jouent un rôle important dans la réponse de défense de la plante, parce que synthétisant de multiples composantes potentiellement protectrices, parmi lesquelles les flavonoïdes (UV protecteur et la phytoalexine), la furanocoumarine (phytoalexine) et la lignine. Leur induction, suite au stress environnemental Fig.7, blessure ou attaque du pathogène, exposition à la lumière UV, exposition à l'ozone, est bien caractérisée, soit au niveau biochimique ou génétique.

La première étape dans la biosynthèse des phényles propanoïdes est régulée par la PAL. Les rapides croissances dans l'activité de l'enzyme dans les conditions de stress sont habituellement importantes mais il semble que la synthèse in situ de l'enzyme est augmentée en corrélation avec l'augmentation de la quantité de mRNA (Chappel & Hahlbroch 1984 ; Ishuziga *et al.* 1991). L'induction de la transcription du gène de la PAL a été observée dans les plantes de raifort (Eckey-Kaltenbach *et al.* 1994) et du bouleau exposé (*Betula penda* ; R. Pellinen et J. Kangasjarvi, en préparation). L'induction de la PAL dans le raifort est extrêmement semblable à l'induction typique de la PAL dûe au pathogène des plantes ou d'une blessure (Kuhn *et al.* 1984 ; Dyer *et al.* 1989), avec des niveaux de transcrits maximum à 6-8 heures et un second pic durant les nécroses, impliquant que l'induction de la PAL dûe à l'ozone, pourrait être mécaniquement assimilée à la réponse de défense dûe au pathogène.

Dans le raifort, deux groupes majeurs de substances phénylpropanoïdes, flavonoïdes glycosidiques et phytoalexine furanocoumarique respectivement, se sont accumulés en réponse à la lumière UV et aux pathogènes (Hahlbroch *et al.* 1976). L'ozone induit soit l'accumulation des deux groupes de métabolites (Ecken-Kaltenbach *et al.* 1994). De cette manière l'ozone paraît présider au développement pré-programmé et aux réponses de la défense, en agissant comme un cross-inducteur à la fois sur les pathways dans la réponse de défense dûe aux UV et au pathogène dans le raifort.

Dans le pin, une exposition pour 8 heures augmente significativement les activités de la PAL, de la CHS, et de la Stilbène Synthétase (STS) (Rosemann *et al.* 1991). Les stilbènes sont des phytoalexines (Hain *et al.* 1993) liés aux flavonoïdes ; les enzymes qui catalysent la première étape dans leur synthèse, la stilbène synthétase, utilise les mêmes substrats comme la CHS. Des augmentations de l'activité de la PAL et de la STS dans le pin ont été observées 24 heures après le début de l'exposition à l'ozone ; l'activité de la CHS, croît plus tard. Il a été remarqué des activités de la PAL et de la STS, dans les pins qui croissent dans une

atmosphère sans ozone, qui augmentent avec le traitement à l'ozone. Au contraire de la PAL et de la CHS, l'activité de la STS n'est pas observable dans les plantes témoins, et l'augmentation de l'activité de la STS et l'accumulation des stilbènes dans la réponse au traitement à l'ozone est une fonction dose-temps. Le récent clonage du gène STS dans le pin (Fliegmann *et al.*) procure un moyen pour étudier l'activation du gène STS dans la réponse au stress.

L'activité maximale de la PAL est habituellement enregistrée seulement dans les tissus spécialisés dans la synthèse de la lignine, comme ces conducteurs d'eau. De plus, la synthèse des quantités croissantes de lignine a été démontrée comme une réponse à l'attaque au pathogène (Jack *et al.* 1992). Bien que la lignine soit une des destinations majeures des substances phénylepropanoïdes, l'induction du pathway dû à l'ozone, peut aussi résulter de l'augmentation de la lignification. Des études sur l'avoine exposée à l'ozone ont montré en effet des augmentations dans l'activité de l'enzyme CAD, qui contrôle la synthèse de la lignine (Galliano, Heller & Sandermann 1993b) et l'induction correspondant un gène de la CAD (Galliano *et al.* 1993a). Le traitement des cultures en suspension avec des champignons inducteurs, induit aussi la transcription des gènes de la CAD. Le génome de l'avoine rouge contient seulement un gène de la CAD (Galliano *et al.* 1993a), qui est ainsi régulé du contrôle du développement, des pathogènes et de l'ozone.

5.3 L'induction par l'ozone des protéines et des gènes de la réponse pathogène

Comme une réponse non spécifique à l'invasion de la part des organismes pathogènes, les plantes synthétisent un groupe de protéines régulées de façon coordonnée, qui pour des raisons historiques sont appelées des protéines liées à la pathogénèse (PR protéine). Les protéines PR sont classées en cinq groupes : PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, sur la base de leur ressemblance (Bowles 1990). Des investigations récentes ont montré que les protéines PR-2 sont des β -1,3-glucanases, les protéines PR-3 sont des chitinases et les protéines PR-5 sont inhibitrices des protéinases. Les plantes contiennent, soit des chitinases, soit des β -1,3-glucanases, qui sont acides extra cellulaires et basiques intra cellulaires (Ward *et al.* 1991 ; Ohashi & Ohshima 1992 ; Raz & Fluhr 1992). Tous ces deux enzymes à la catalysent l'hydrolyse les principaux composants des parois cellulaires des champignons, et cette façon entaillent le processus d'invasion et jouant un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes (Broglie *et al.* 1991). De surcroît aux protéines PR, beaucoup d'autres gènes sont induits par les initiateurs des pathogènes de fonction méconnue ont été découverts (Bowles 1990).

Des études récentes dans la biochimie et la biologie moléculaire des réponses aux plantes à l'ozone atmosphérique élevé ont indiqué des activités croissantes de beaucoup de protéines PR dans le tabac (Schrauder *et al.* 1992) et dans l'avoine rouge de la Norvège (Karembi *et al.* 1994) ; ainsi, beaucoup d'autres gènes de la réponse pathogène (Somssich *et al.* 1989) ont été induits. L'induction de la synthèse des protéines par l'ozone dans le raifort et des cultivars de tabac Bel W3 et Bel B, ont montré l'augmentation du RNAm et des activités

enzymatiques qui pourraient être observées, immédiatement après l'exposition à l'ozone. Dans le tabac sensible à l'ozone Bel W3, l'augmentation de l'activité β -1,3-glucanase est de 30 fois plus élevée que dans les plantes témoins, où leur activité enzymatique est presque nulle. La croissance de l'activité enzymatique résulte de l'activation de la transcription des gènes correspondant à nouveau (Ernst *et al.* 1992) et l'augmentation de la transcription du gène est remarquée 1 heure après l'exposition à l'ozone.

Une étude complète de l'induction dans l'expression du gène de la défense dans le raifort, montre que tous ces gènes induits par le pathogène, sont aussi induits par l'ozone (Eckey-Kaltenbach *et al.* 1994). Les gènes liés à la défense pourraient être classés en trois groupes suivant le temps d'induction : les gènes rapides, intermédiaires et lents. Le maximum des périodes de pré-induction par les groupes sont respectivement 3,6 et plus de 10 heures après le traitement à l'ozone. Les gènes induits rapidement sont les gènes des protéines PR et le gène initiateur induit (Eli-6, Somssich *et al.* 1989), dont leur fonction est méconnue. Tous ces gènes intermédiaires sont membres du pathway des phényles propanoïdes. Les gènes lents incluent les gènes des peroxydases et ceux des glycoprotéines riches en hydroxy proline. Les cinétiques d'induction de tous ces gènes ressemblent aux cinétiques de leur induction par l'ozone.

5.4 Induction des systèmes détoxificateurs des espèces d'oxygène actif en réponse au stress oxydatif

Le stress oxydatif dans les plantes n'est non seulement causé par l'ozone, mais aussi par les autres polluants de l'air. Plusieurs réactions dans le métabolisme normal des plantes, par exemple dans la chaîne de transport des électrons dans les chloroplastes et dans les mitochondries, produisent des espèces d'oxygène réduit, comme les radicaux superoxydes et les peroxydes d'hydrogène. Les plantes contiennent des enzymes comme les peroxydases, catalases et les superoxydes dismutases (SOD), capables de nettoyer ces oxy radicaux dangereux (voir Foyer, Descouvières & Kunert 1994a pour une revue). La SOD dismute le superoxyde en H_2O_2 et O_2 . Fig.4. Les peroxydases, comme l'ascorbate peroxydase (AP), conséquemment réduisent le H_2O_2 en eau utilisant l'acide ascorbique comme donateur d'électron. L'acide déhydroascorbique résultant est recyclé en ascorbate, utilisant le glutathion (GSH) et le GSSH formé est recyclé en GSH, sous l'action de la glutathion réductase (GR). Une forte induction de ces enzymes du pathway de Halliwell-Hasada a été rapportée dans différentes situations de stress (Bowler, Van Montegu & Inzé 1992).

Récemment le rôle de la SOD dans le développement des plantes et dans les réactions de défense ont été passés en revue par (Bowler *et al.* 1992) ; ici nous pouvons faire un brêf résumé de la question. Les augmentations de la concentration de l'ozone atmosphérique ont été désignées provoquer des croissances des activités enzymatiques de la SOD (Chanway & Runeckles 1984, Castillo *et al.* 1987 ; Sen Gupta *et al.* 1991). Le mécanisme de l'induction de l'activité de la SOD est en majeure partie méconnue. Seulement, ce n'est que tout récemment que des études pour analyser l'induction des gènes spécifiques ont été menées. Dans les expériences de Hérouart, Van Montegu & Inze (1993), ont été produites des plantes

transgéniques à l'intérieure de laquelle un gène reporter a été combiné avec la région promotrice de la Cu/Zn SOD du *Nicotiana*. La Cu/Zn SOD du tabac a été induite par plusieurs anti oxydants avec des groupes sulfhydrile réduits, par exemple le glutathion réduit, mais non par exemple par le H₂O₂ ou de l'herbicide paraquat (producteur de super oxyde), ou du glutathion oxydé. De tels résultats ont suggéré que les augmentations des anti oxydants thiols dans la cellule puissent réguler l'expression des gènes SOD. Ces études sont nécessaires, pour apporter la lumière sur le rôle de la SOD, dans la protection des plantes contre le dommage dû à l'ozone. Même si les résultats de l'activité de la SOD sont contradictoires sur leurs augmentations, il a été cependant noté dans les expériences sur l'épinard et le haricot vulgaire, une réponse au traitement à l'ozone. Mais dans d'autres expériences, comme le blé et le haricot vulgaire et l'épinard, aucune augmentation dans l'activité enzymatique n'a été observée (voir Bowler *et al.* et référence). Une preuve majeure est que dans les plantes transgéniques, surproduisant la SOD chloroplastique, aucune croissance dans la résistance à l'ozone, n'a été enregistrée (Pitcher *et al.* 1991) ; plutôt il y a une réduction du dommage cellulaire à travers les radicaux oxygène produits avec l'herbicide paraquat (Bowler *et al.* 1991 ; Sengupta *et al.* 1993).

L'induction de l'activité enzymatique de l'ascorbate peroxydase de la part de l'ozone, AP (Castillo *et al.* 1987, Peter *et al.* 1989 ; Mehlhorn 1990) et de la glutathion réductase, GR (Tana, Saji & Kondo, 1988 ; Sen Gupta *et al.* 1991 ; Madamanchi *et al.* 1992 ; Wingsle *et al.* 1992), est liée à l'induction de la SOD, puisque ces enzymes sont impliquées dans le pathway de Halliwell-Asada, successivement à la neutralisation du super oxyde Fig.8. Ces systèmes sont localisés pour la majeure partie dans les chloroplastes Fig.9, où participent à l'élimination des espèces oxygène-réactif générées dans la photosynthèse ; de même les enzymes cytoplasmiques ont été caractérisés (Madamanchi *et al.* 1992). Il a été suggéré que le glutathion réductase pourrait jouer un rôle important dans la détoxification des radicaux oxygène (Tanaka *et al.* 1985, Tanaka, Machida & Sugimoto 1990). Les plantes transgéniques sur exprimant les enzymes du métabolisme du glutathion sont ainsi générées (Aono *et al.* 1991 ; Foyer *et al.* 1994a, b), pour étudier leur implication dans le pathway. Les plantes transgéniques du tabac qui ont exprimé le gène de la glutathion réductase (Aono *et al.* 1991), sont en effet plus résistantes au stress oxydatif causé par l'herbicide le paraquat, mais ne montrent aucun changement à leur sensibilité à l'ozone. Ceci et les résultats de la surexpression de la SOD chloroplastique, (Bowler *et al.* 1991 ; Pitcher *et al.* 1991) ont suggéré que la localisation subcellulaire des premières réactions, induites par l'ozone qui conduisent au dommage cellulaire pourrait être dans l'aploplaste ou à proximité de la membrane plasmique (Luwe, Takahama & Heber 1993). Cependant, les effets extracellulaires de la production des radicaux oxygène induits par l'ozone dans l'état général oxydatif de la cellule, où le cycle de l'ascorbate-glutathion pourrait protéger la cellule, restent méconnus. On pourrait répondre à cette question à l'utilisation des plantes transgéniques dans lesquelles de telles séquences régulatrices seraient réunies avec des gènes reporter (Herouart *et al.* 1993) ou la surexpression des enzymes des pathways anti oxydatifs (Foyer *et al.* 1994).

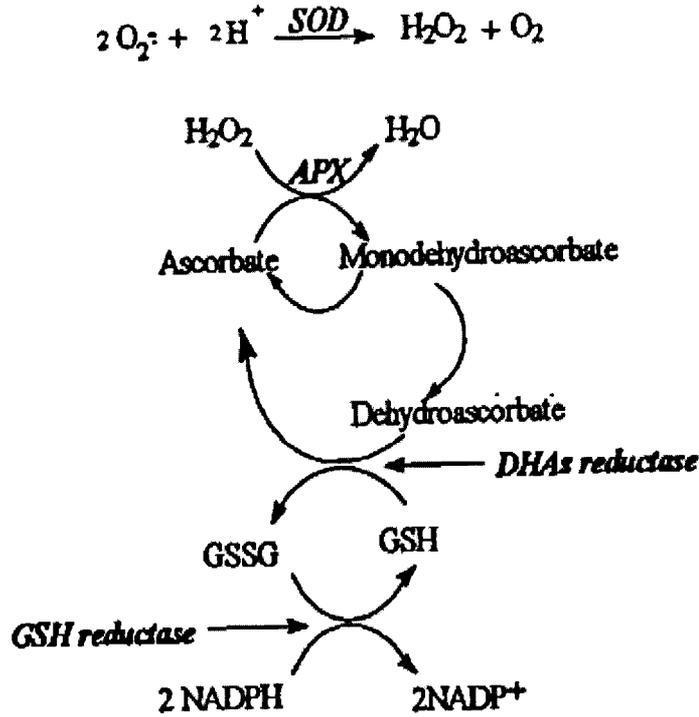


Fig.8: Réactions inducibles dans le pathway de Halliwell-Asada, éliminant des radicaux hydroxyls dans les plantes. Abréviations: GSH, glutathione réduit; GSSG, glutathione oxydé. Enzymes catalysant les réactions sont indiquées avec les numéros suivants: 1, Super Oxyde Dismutase; 2 Ascorbate Peroxydase: APX;3, DéHydro Ascorbate réductase: DHAs.

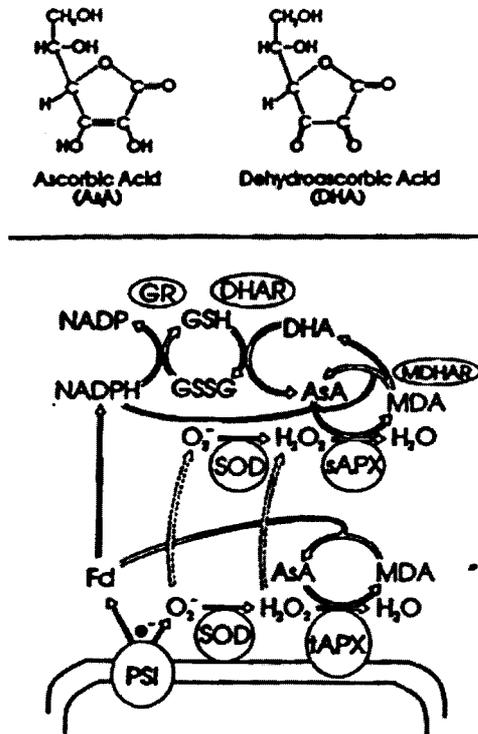


Fig.9: Structure de l'acide ascorbique (Asa), de l'acide déhydroascorbique (DHA) et les intermédiaires de l'oxygène réactif, impliqués dans le pathway des chloroplastes des plantes (modifié par Asada, 1994). Les radicaux superoxydes (O_2^-), sont dismutés par la SOD, associé avec le PSI et le H_2O_2 et le résultat est éliminé par l'APX, lié aux thylakoïdes (tAPX). Les espèces d'oxygène réactif qui échappent à la destruction au niveau des thylakoïdes ont été éliminés à la fois par la SOD et l'APX (sAPX) des stroma. Les radicaux de monodéhydroascorbate (MDA), produits par APX sont convertis en AsA à travers les réactions avec les Fd ou monodéhydroascorbate réductase (MDHAR). Réduction de DHA en AsA est catalysée par la déhydroascorbate réductase (DHAR), via le pathway de l'ascorbate : glutathion.

6. La concertation entre les divers systèmes de réponse à l'ozone

6.1 Les pathways des réactions de défenses induits par l'ozone

Plusieurs des articles mentionnés ci dessus ont indiqué des similarités entre les réactions induites par l'ozone dans les plantes et celles du stress général. Au niveau moléculaire, les réactions induites par l'ozone dans les plantes sont assez similaires, par exemple aux réactions induites par les pathogènes ou la blessure. Les croissances induites par l'ozone dans les activités enzymatiques, sont provoquées par l'activation rapide de divers gènes, comme les gènes pour les enzymes régulés dans la synthèse de l'éthylène, l'ACC synthétase, la Pal, la CHS et la CAD, qui contrôlent respectivement les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les pathways de la synthèse de la lignine et de plusieurs protéines PR. Le signal de transduction des pathways de ces réactions induites de défense dans les interactions plante-pathogène, ont été étudiés et donnent une bonne comparaison pour suivre le signal de transduction des réactions induites par l'ozone. Non seulement, il y a des similarités entre les réponses des plantes à l'ozone et au pathogène, mais aussi ces deux processus pourraient être corrélés. Par exemple, quand plusieurs génotypes de blé sont soumis au criblage pour leur résistance, aux marques marronnes dues aux champignons (*Pyrenophora tritici-repentis*), ces génotypes susceptibles résultent être sensibles à l'ozone (Sah, von Tiedmann & Fehrmann 1993).

La majeure partie des gènes de défense des plantes sont hautement régulés et sont exprimés durant le développement de manière spécifique dans le tissu. De cette manière les mécanismes régulateurs de ces gènes de défense devraient incorporer des modèles spécifiques de développement avec les signaux du stress environnemental (Douglas *et al.* 1991). Plusieurs gènes de défense des plantes, induits par l'ozone ont conservé les séquences nucléotidiques régulatrices liées à des protéines dans leur promoteur (Goldsbrough, Albrecht & Stratford 1993 ; Yu, Lamb & Dixon 1993). Ces séquences communes sont présumablement responsables dans l'induction régulée et coordonnée de divers gènes de défense en réponse au pathogène et à la blessure. Des informations disponibles, dans l'expression des gènes induits par l'ozone dans les plantes, ont suggéré une induction non spécifique des systèmes de défense ; c'est ainsi que le signal de transduction des pathways responsables de l'expression du gène induit par l'ozone utilise les composants du signal de transduction du pathway de la réponse au stress général.

6.2 L'explosion oxydative

Il a été montré que l'O₃, en tant que tel n'est pas dangereux pour la membrane plasmique (Grimes, Perkins & Boss 1983), et est dégradée en super oxyde, peroxyde et radicaux hydroxyle (Hoigné & Bader 1975) ; il se forme l'oxygène singulier quand il réagit avec les molécules biologiques (Kanofsky & Sima 1991). La formation de ces molécules d'oxygène actif dans les tissus des plantes, après l'exposition à l'ozone a été mise en évidence avec la spectroscopie de résonance du spin de l'électron (Mehlhorn *et al.* 1990). Ces espèces d'oxygène actif sont plus probablement responsables de la lipopéroxydation des lipides de la membrane plasmique, qui a été démontrée, a lieu après le traitement par l'ozone (Pauls & Thompson 1980; Heath 1987; Chevrier *et al.* 1990). Vraisemblablement, durant les premiers stades des interactions plante-pathogène (Delvin & Gustine 1992; Schwacke & Hager 1992) ou l'exposition à la lumière UV, la génération des radicaux superoxydes se déroule dans l'apoplaste. Cette explosion oxydative a une grande signification dans les réactions cellulaires ; On peut penser que ces radicaux oxygène, dérivés de l'ozone pourraient activer le signal de transduction des voies métaboliques, conduisant aux réponses de défense dans les cellules des plantes exposées à l'ozone, comme c'est décrit dans plusieurs références relatives avant, normalement associées à l'invasion pathogène.

6.3 La possible action de l'acide jasmonique comme signal transducteur de l'induction par l'ozone

Des progrès récents dans l'élucidation du signal transducteur dans les plantes, durant l'induction des réactions de défense, ont montré un rôle central par un produit d'oxydation de l'acide linoléique, composante normale des membranes, l'acide jasmonique (JA), et son méthyle ester, méthyle jasmonate, dans l'induction de la transcription des différents gènes de la défense, avec les inhibiteurs des protéinases (Farmer, Johnson & Ryan 1992; Staswick 1992), PAL (Dittrick, Kutchan & Zen 1992 ; Gundlach *et al.* 1992) et CHS et 4-CL (Dittrich *et al.* 1992). De plus à la régulation des gènes de défense, le JA et le MeJA agissent dans les réactions de la sénescence (Chou & Kao 1992). La formation de l'acide linoléique évoque l'activation induite des lipoxygénases (Bell & Mullet 1991) et des différents stades de la peroxydase, qui sont induites par exemple par les initiateurs des parois cellulaires des champignons (Bostock *et al.* 1992 ; Crimes, Koetje & Franceschi 1992). On pourrait faire l'hypothèse que la lipopéroxydation observée dans la membrane plasmique, soit induite par l'ozone directement ou à travers le H₂O₂ (Pauls & Thompson 1980 ; Heath 1987; Chevrier *et al.* 1990) et l'induction de l'activité de la lipoxygénase et des gènes de la transcription avec le traitement à l'ozone (Maccarone Veldink & Vliegenthart 1992) pourrait conduire à la formation de JA ou de MeJA, ou de quelques uns de leurs précurseurs. Ces réactions pourraient être impliquées dans les mécanismes de dommage de l'ozone à travers, soit aux réactions d'hypersensibilité ou de l'activation du gène de la défense, ou de l'induction de la sénescence.

Dans le raifort, le MeJa et ses précurseurs sont actifs dans l'induction du gène de la défense, conduisant à l'accumulation des glycosides et des flavonoïdes, comme apiin (Dittrich *et al.* 1992). Tout récemment, des études sur l'induction et l'accumulation de 6-O- malonyl apiin (Eckey-Kaltenbach *et al.* 1994), ont été mises en évidence. L'ozone est le troisième inducteur connu des glycosides flavonoïdes dans le raifort et des expériences approfondies ont montré si son action se traduisait par l'intermédiaire de JA et de ses précurseurs.

6.4 L'éthylène comme signal transducteur

Il a été proposé que la synthèse rapide de l'éthylène du stress dans les différentes espèces de plante, pourrait agir comme un messenger secondaire dans la réponse de la plante à l'ozone (Taylor *et al.* 1988; Mehkorn 1990). Le sens et la nature de la production de l'éthylène du stress et ses interactions avec le système de défense des plantes en général ne sont pas encore connus. L'éthylène est reconnu comme un inducteur des réactions de défense de beaucoup de plantes (Ecker & Davis 1987), mais son rôle exact est encore à déterminer. Il pourrait jouer un rôle primaire dans le signal de transduction conduisant à l'expression du gène de défense, ou seulement pourrait être d'importance secondaire.

L'ozone fait croître la transcription et les activités des protéines PR intracellulaires et basiques (PR-1, PR-2 et PR-3), dans le raifort (Eckey-Kaltenbach *et al.* 1994) et Bel W tabac (Ernst *et al.* 1992 ; Schraudner *et al.* 1992). Dans les premières études (Langebartels *et al.* 1991), avec les mêmes cultivars de tabac, la synthèse d'éthylène de stress a été augmentée plusieurs fois dans l'ozone sensible Bel W3. L'éthylène a été reconnu induire le PR-1 intracellulaire (Eyal, Sagee & Fluhr 1992 ; Raz & Fluhr 1992) ; mais si cette induction est directe ou si l'éthylène seulement module l'activation du gène (Huges & Dickerson 1991), ceci est encore à élucider. Les glucanases et les chitinases basiques du tabac induites par l'ozone (Ernst *et al.* 1992; Schraudner *et al.* 1992), appartiennent respectivement au groupe de PR-2 et PR-3. Il arrive que durant la tentation de spéculer, que se passe une activation similaire à celle de l'éthylène à travers laquelle la transcription des gènes basiques PR-2 et PR-3, pourrait se passer puisque l'activation de la transcription des gènes soit évidente dans Bel W3, ozone-sensible (Ernt *et al.* 1992), où la production d'éthylène de stress soit ainsi élevée (Langerbartels *et al.* 1991).

Avec le tournesol, des expériences de suspension cellulaire avec les inhibiteurs de synthèse d'éthylène, ont suggéré un rôle direct de l'ACC dans l'induction de l'activité de la chitinase, qui coïncide avec l'accumulation de l'ACC endogène, le précurseur de l'éthylène (Siefer *et al.* 1994). L'activité de la chitinase induite par l'éthylène est le Ca^{2+} dépendant (Raz & Fluhr 1992), ainsi l'accroissement de la concentration de Ca^{2+} , après l'exposition à l'ozone (Castillo & Heath 1990), pourrait jouer un rôle dans l'induction de la synthèse de l'éthylène du stress, lié aux systèmes de défense. Des expériences plus poussées dans les plantes transgéniques dans lesquelles, la synthèse d'éthylène du stress interdite avec l'anti sens

silencieux (Klee & Stelle 1991; Romano, Cooper & Klee 1993), ont montré que les gènes de l'ACC synthétase induits par l'ozone ne se sont pas exprimés.

7. Bio marqueurs et leur signification

Il serait extrêmement utile d'identifier un certain nombre de bio marqueurs pour définir une situation de stress oxydatif dû à l'ozone et pour prédire le type de réponse.

A la lumière des mécanismes complexes de défense ci-dessus décrits, il devient toujours plus nécessaire d'identifier un nombre limité de bios marqueurs (activité enzymatique, concentration de certains métabolites, expression de certains gènes, etc.) qui constituent des indicateurs pour une situation en début de stress oxydatif dû à l'ozone. De tels marqueurs devraient aussi permettre de faire le monitoring de la réponse des plantes au stress et de prévoir l'évolution du système dans le temps (d'une part la réponse active, activation des mécanismes de défense, élimination des espèces nocives, réparation du dommage, développement de la résistance; d'autre part, la possible propagation du dommage, dépassement de la capacité de réponse de la plante, installation des lésions toujours plus graves, mort cellulaire, mort de la plante). Dans les cas les plus chanceux, de tels marqueurs pourraient être utilisés pour la stratégie de bio monitoring.

Un marqueur *idéal* de stress devrait posséder des prés requis suivants :

- être facilement mesurable;
- être sensible au stress (le stress induit des variations significatives du paramètre)
- être stable en manque de stress (donc être peu sensible aux autres paramètres et être relativement constant dans le temps);
- être peu variable d'une espèce à l'autre;
- être spécifique pour un certain type de stress;
- être prévisible d'un certain type d'évolution (réponse active; ou dommage irréversible).

Evidemment en pratique, il est difficile de trouver un marqueur qui satisfasse à tous ces requis listés ci-dessus; quoique une analyse attentive des données de la littérature nous permettrait pour le moins d'indiquer des variables avec des caractéristiques acceptables, qui puissent être testées ultérieurement au laboratoire.

De tels marqueurs consistent essentiellement en:

- activités enzymatiques;
- concentrations de certains métabolites;
- expression de certains gènes.

Ceux qui sont jusqu'à maintenant et de façon diffuse étudiés sont les suivants:

SOD, POD, MHAR, DHAR, Glutathion Réductase, etc. entre les activités enzymatiques;

Glutathion, Acide ascorbique, comme métabolites secondaires,

Acide salicylique, Ethylène, Flavonoïdes comme substance à bas poids moléculaire ;

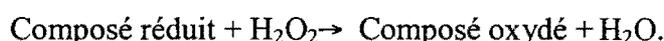
L'expression de quelques gènes tels que ceux de la SOD, APX, etc.

7.1 Possibles biomarqueurs : la littérature

L'exposition des plantes aux polluants de l'air induit beaucoup de changement dans les processus physiologiques et biochimiques (Koziol MJ, Whatley FR, eds 1981, Winner WE, Money HA, Goldstein DA, eds 1985). Des marqueurs biochimiques, parmi les quels quelques activités enzymatiques et quelques métabolites pourraient être utilisées pour suivre rapidement les altérations métaboliques dans les plantes qui ont lieu avant la parution des dommages visibles ou de la diminution de la récolte. Cependant, le fréquent manque de spécificité des marqueurs singuliers, crée le besoin de criblage simultané de plusieurs marqueurs biochimiques. A cet effet, il est intéressant le travail publié récemment par (Wellburn F.A. & Wellburn A.R 1996), qui a suivi systématiquement les variations de différents métabolites primaire et secondaires dans beaucoup d'espèces végétales suite à l'exposition à l'ozone. Parmi les diverses variables analysées-éthylène, putrescine, spermidine, polyamines totales, phénol totaux, glutathion réduit, glutathion total, ascorbate total-les plus attendus semblent être les polyamines et l'éthylène, même si le schéma de la réponse résulte être trop complexe et variable d'une espèce à une autre.

Dans notre recherche, nous nous sommes servis fondamentalement de marqueurs enzymatiques, amplement testés parmi lesquels la **SOD**, l'**APX**, **GPX** et les **Peroxydases totaux**. Sur cette thématique, il existe une abondante littérature, bien que le diagnostic significatif et le pronostic des variations de ces activités enzymatiques n'aient pas encore été définitivement éclairés.

Les peroxydases (donneur: H_2O_2 , oxydoréductases; EC 1.11.1.7), sont utilisées comme marqueurs biochimiques du stress des plantes en général, ainsi que pour le stress de polluant de l'air. (Castillo FJ, Greppii H 1986, Curtis CR, Howell RK, Kremer DK 1976, Mehlhorn H 1986, Patton RL, Garraway Z 1986). Le stress d'habitude fait augmenter l'activité peroxydasique, déterminée suivant cette réaction.



Certainement, les polluants de l'air, tel que l'ozone et le di oxyde de soufre, sont connus pour faire augmenter l'activité peroxydasique (Curtis CR, Howell RK, Kremer DK 1976, Garraway Z, 1986); toutefois l'effet de l'ozone est trouvé plus marqué sur l'activité des peroxydases extracellulaires que sur l'activité peroxydasique dans les extraits cellulaires totaux (Castillo FJ, Greppin H1986).

La super oxyde dismutase (SOD) est une enzyme impliquée dans les processus d'élimination des radicaux super oxyde provenant de l'exposition à l'O₃. En effet, les radicaux oxygène, produits ubiquistes, proviennent de la réduction mono électronique et de l'O₂, sont parmi les plus réactifs composants connus. Leur production dans les organismes vivants pourrait conduire à l'inactivation des protéines (Mead, 1976) et au dommage de l'ADN (Breawn et Fridovich, 1981). Pour minimiser le dommage des radicaux oxygène, les cellules sont dotées de système enzymatique pour nettoyer ces potentiels dangereux radicaux. La super oxyde dismutase (SOD; O₂^{·-}: O₂^{·-}; oxyde réductase; E.C.15.1.1) catalyse la dismutation des deux radicaux super oxyde, pour produire le peroxyde d'hydrogène et le di oxygène.

Comme, c'est démontré (G.R Matters et J.G. Scandalios 1987), après l'exposition à l'ozone, il n'y a pas de variation de l'activité superoxydodismutase. La SOD pourrait être un indicateur de la concentration d'O₂^{·-}. Récemment, (Mckersie *et al.*1982), ont examiné l'activité enzymatique de la SOD dans les souches soit tolérante, que sensible de *Phaseolus vulgaris* L. Ils n'ont aussi trouvé aucune différence au niveau intrinsèque, de la SOD dans les cultivars et ont conclu que l'enzyme joue un rôle mineur après l'exposition à l'ozone. Ces résultats sont parfaitement corrélés à nos études sur le même type de matériel végétal.

8. But de la recherche et la stratégie adoptée

La présente recherche se propose d'analyser les effets du stress dû à l'ozone dans les plantes et les réponses biochimiques induites par ce type d'agent polluant. En particulier, nous nous sommes proposés d'identifier et d'évaluer quelques paramètres biochimiques représentatifs dans des systèmes modèles soumis au stress dû, afin d'évaluer l'évolution de ces valeurs en fonction du type d'exposition à l'ozone et du type de réponse de la réponse. Au terme de ce travail, sont proposées des applications pour des études de monitoring.

La recherche est articulée fondamentalement en ces phases suivantes :

- i) Sélection des paramètres biochimiques importants au cours du stress dû à l'ozone.
- ii) Vérification de leur comportement dans des modèles expérimentaux.
- iii) Analyse comparée des variations observées et interprétations en termes de quantification du dommage et la prévision de la réponse : fiabilité des différents bio marqueurs ; analyse du comportement différentiel sensible/résistant.
- iv) Possible application à des stratégies de monitoring.

i) La première phase de la recherche s'est focalisée sur l'individualisation d'un certain nombre raisonnable de paramètres biochimiques qui fussent sensibles au stress oxydatif dû à l'ozone, qui fussent également facilement mesurables et puissent montrer des variations bien définies en relation avec l'entière du stress dû à l'ozone et à l'évolution de la plante (survivance ou mort). Cette phase de la recherche s'est initialement fondée sur une investigation poussée des données de la littérature existante dans la thématique. Il a été observé que les paramètres plus communément utilisés, afin de définir une situation de stress au **niveau biochimique** et non macroscopique seraient représentatifs de la concentration de quelques importants métabolites, du niveau de quelques activités enzymatiques et de l'expression de quelques gènes. Particulièrement significatif, est le cas de certaines activités enzymatiques qui nous ont donné un cadre direct du stade métabolique des plantes et de l'activité différentielle des différentes voies métaboliques concurrentes. Parlant du stress oxydatif, il a été subitement remarqué que les activités enzymatiques plus communément étudiées dans la littérature sont la super oxyde dismutase, les différents peroxydases, les enzymes du métabolisme du glutathion, des enzymes du métabolisme de l'acide ascorbique, les catalases. Parmi ces activités enzymatiques variées, nous avons sélectionné la **SOD**, les **peroxydases totaux**, l'**ascorbate peroxydase**, le **gaïacol peroxydase** et la **syringaldazine** et nous avons fait leur monitoring dans des conditions de stress dû à l'ozone. Nous avons noté que le niveau de quelques métabolites à fonction anti oxydant parmi lesquels l'ascorbate et le glutathion ont une bonne prédiction significative, comme ainsi la concentration de quelques

métabolites cruciaux dans les systèmes de défense tels que l'éthylène et l'acide salicylique. Ces métabolites particuliers seront l'objet des prochaines études.

ii) Une fois sélectionnés quelques bio marqueurs d'intérêt (dans notre cas, préférentiellement l'activité enzymatique), nous nous sommes proposés à évaluer le comportement dans la plante soumise au stress dû à l'ozone en conditions contrôlées. Le paramètre d'intérêt a été monitoré en conditions normales (contrôle) et ensuite sous traitement (traité). Une attention particulière a été consacrée à l'évolution temporelle du paramètre d'intérêt-le paramètre a été évalué à pas de temps, jusqu'à **96 heures** de traitement-comme ainsi à la dépendance du paramètre observé selon les modalités de traitement-concentration, temps et modalité d'exposition-.Il a été en pratique procédé à un premier criblage, pour évaluer la fiabilité et le bien fondé des bio marqueurs sélectionnés.

iii) Dans cette phase d'analyse une attention particulière a été accordée à l'évaluation comparée de l'évolution des différents paramètres en relation au type de stress soumis. Mis en évidence les divers bio marqueurs, parmi lesquels capables de donner des réponses significatives au stress, cohérentes et reproductibles, on a voulu corrélérer le type d'évolution du paramètre avec l'entièrete du stress et du type de réponse induite dans la plante. Une attention particulière a été apportée à la corrélation changement métabolique/réponse active ; changement métabolique/développement du dommage irréparable. En d'autres termes, nous avons cherché à voir quel type d'évolution de paramètres fût indice de souffrance. Particulièrement significatif, le cas de **Phaseolus vulgaris** où une activation élevée de certains enzymes soit indice de souffrance de la plante et corrélée à une situation de sensibilité au stress, par contre une réduction de l'activation enzymatique est signe de tolérance au stress. Analogiquement, dans le cas de **Arabidopsis thaliana**, nous avons vu que le niveau de APX à 24 heures à l'exposition, corrélée à l'entièrete du dommage. Enfin, il est à considérer le système **Conyza bonariensis**, pour voir s'il y a résistance croisée entre stress oxydatif dû au paraquât et stress oxydatif dû à l'ozone. Les paramètres biochimiques des espèces sensible et résistante au paraquât ont été évalués suite à une réponse dûe à l'ozone.

iv) La phase ultime de la recherche est dévolue à considérer les possibles applications de nos études à la stratégie de bio monitoring. En d'autres termes, nous avons voulu considérer si les paramètres biochimiques recherchés, puissent être utilisés en champ pour individualiser des situations en début de stress dû à l'ozone, avant qu'il ne se manifestât macroscopiquement le dommage. Certaines plantes sensibles à l'ozone sont actuellement employées au niveau expérimental pour la stratégie de bio monitoring, pour évaluer le dommage biologique des concentrations d'ozone présentes dans les agglomérations urbaines et les aires métropolitaines. Les études actuelles se basent exclusivement sur des données morphologiques et anatomo-pathologiques ; l'application de nos méthodes à des stratégies de bio monitoring s'accorderait à une évaluation du stress en termes plus strictement quantitatifs, qui utilisent des paramètres biochimiques précis, ainsi pourrait permettre une détermination plus pointue, à une évaluation de l'entièrete de la pollution atmosphérique et de la possible interaction entre les divers agents toxiques.

MATERIEL ET METHODE

9. Modèle expérimental pour la réponse à l'ozone de *Phaseolus vulgaris*: germination et fumigation

Les semences de haricot (vulgaire, cv. pinto, ozone sensible ; cv. groffi, ozone résistant), ont été mises à germer dans une serre pour 10-15 jours, de ce fait ont rejoint le stade de rosette. Cette exposition à l'ozone à 120 ppb a été réalisée, pendant 4 h. cfr exposition suivante.

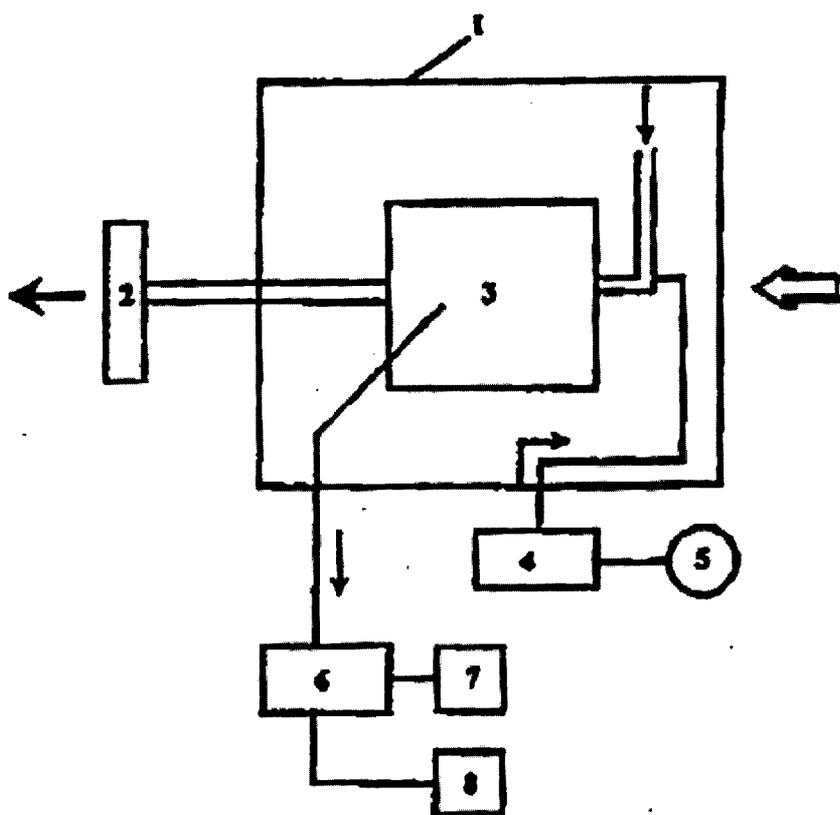


Fig.9: Représentation schématique de l'installation utilisée pour le traitement des plantes avec l' O_3 (1 = cellule de Bertini; 2 = aspirateur d'air Aeron; 3 = chambre de fumigation en Perspex; 4 = générateur d' O_3 Fisher; 5 = bombonne d' O_2 ; 6 = analyseur Monitor LABS 8810; 7 = enregistreur sur papier LKB; 8 = unité centrale d'acquisition de données)

10. Modèle expérimental pour la réponse à l'ozone de *Conyza bonariensis* : germination, exposition à l'ozone traitement au paraquat

Les semences de *Conyza bonariensis* (c.v ozone sensible e c.v ozone résistant), ont été mises en germination dans une serre pour deux (2) mois. A cet âge, les plantes ont le stade de rosette. Le traitement avec l'herbicide, le paraquat a été effectué utilisant une concentration de 0,001%. Le paraquat a été pulvérisé sur les feuilles ou bien distribué avec un pinceau.

L'exposition des plantes à l'O₃ pour des temps brêfs (5h), à la dose de 200 ppb ou des périodes longues (si non 15 jours) a été effectué dans un environnement complètement contrôlé, afin d'opérer de manière répétitive et reproductible. Pour cet objectif, il a été utilisé l'installation de fumigation localisée près de San Grado de la Section de Pathologie Végétale du Département de Cultures et de Défense des Espèces Ligneuses de l'Université de Pise. Ceci est constitué d'une cellule climatique (Bertagin), les quelles dimensions utiles sont 2.70 x 2.90 x 2.00 m, à l'intérieur de laquelle les paramètres environnementaux (lumière, température et U.V) ont été maintenus à des valeurs choisies, à travers les systèmes automatiques de contrôle. Une boîte en Perspex (dimensions: 1.30 x 0.75 x 1.00), se trouve dans cette dite cellule, ventilée de façon continue avec l'air, provenant de cette cellule, en immersion en flux continu de renouvellement total, capable de garantir deux changements d'air à la minute au préalable en filtration sur carbone actif. L'entrée de l'air dans la boîte, à travers 5 ouvertures (0.05 m de diamètre), réalisées sur un de côtés mineurs grâce à la présence d'une lame de Perspex, ainsi trouée, qui rompt les filets d'air à l'entrée, assurant ainsi une homogénéisation satisfaisante. A chaque renouvellement, l'air est ainsi aspiré à travers un trou (0.1 m de diamètre) réalisé dans le côté opposé à celui de l'entrée, filtrée et immergée à l'externe à travers un aspirateur-dépurgateur (Maczero Toxigas 900, Areon). Le flux est intercepté, à une distance de 0.4 m du point d'entrée de la chambre, par un tube en téflon (0.005 m de diamètre), qui convoie l'O₃ à l'intérieur de la chambre, permettant un mélange adéquat avec la masse d'air à l'entrée.

L'ozone est généré à partir de l'O₂ pur dans la bonbonne, à travers la décharge électrique produite par un générateur spécifique (Fisher 500), refroidi par l'air; laquelle quantité en sortie est fonction de l'intensité de la décharge électrique et du flux d'O₂ à l'entrée du générateur. La concentration du polluant à l'intérieur de la chambre est continuellement mesurée; le mélange air-O₃, échantillonné par l'intermédiaire d'un tube en téflon, installé à la hauteur de la plante, et est convoyé à un analyseur automatique (mod. 8810 Monitor Labs), fonctionnant sur la base du principe de l'absorption de la lumière U.V. L'analyseur est connecté à un enregistreur sur papier à deux traces (LKB Mod. 2210) et à un système d'ordinateur basé sur un PC, doté d'un software spécifique. Dans la Fig.9 est représenté schématiquement le système décrit.

Les fumigations ont été réalisées à 20±1°C de température, 85±5% de UR, radiation photosynthétiquement active (PAR: $\lambda = 400-700\eta\text{m}$) 500 $\mu\text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Les plantes précédemment sélectionnées ont été installées dans une cellule climatique, au moins **48h avant** la fumigation, pour permettre l'adaptation aux conditions climatiques fixées par l'expérimentation. Une fois passée cette période, lesquelles plantes soumises au traitement sont disposées, de manière aléatoire suivant la thèse de leur appartenance, à l'intérieur de la boîte sur un lit de perlite humide. Le matériel de contrôle est maintenu dans les mêmes conditions, à l'exclusion du traitement au polluant, à l'intérieur de la cellule climatique.

11. Modèle expérimental pour la réponse à l'ozone d'*Arabidopsis thaliana*: germination et exposition à l'ozone

Le matériel utilisé est *Arabidopsis thaliana* ozone résistant Columbia (Col-0) et ozone sensible, un mutant (*ozs2*). Ces souches ont été sélectionnées dans le Laboratoire de Professeur Jaakko KANGASJARVI à Helsinki en Finlande, à l'Institut de Biotechnologie dans le Département de Biosciences, Division de Génétique à Viiki Biocentre.

Les semences sont mises en germination, en mélangeant les composantes tourbe: terre: vermiculite, dans un rapport 1 : 1 : 1, tous ensemble dans un contenant. Ces semences sont baignées au dessus, après être mises dans le milieu et ensuite surmontées d'un couvercle en plastique pour empêcher l'évaporation durant la phase de germination.

Cette stratification a lieu dans l'obscurité en un lieu à 4 °C durant 3-5 jours.

Après cette stratification, les semences sont déplacées dans les chambres de croissance, période considérée comme premier jour pour évaluer l'âge des plantes.

Les chambres de croissance donnent les conditions de croissance standard selon le programme suivant: température 23 /18 °C cycle jour/nuit; humidité relative (valeur moyenne) 67% de jour/92% de nuit ; 12 heures de photopériode (la lumière commence à 6:30 et nécessite 30 minutes pour arriver à 100%, puis à 19:00, la lumière diminue et arrive à 0% à 19:30) 100% d'illumination sont 250 à 300 microEinsteins, pour nos conditions. Les chambres sont en air filtré et que les plantes croissent sans ozone, jusqu'à la fumigation.

Les semences sont mises initialement en densité moyenne (à peu près 200-300 semences disposées si possible dans des contenants de dimensions 30 cm x 30 cm, remplis de terreau à la hauteur de 10 cm. Les semences sont laissées à germer et croître pour presque 1-1.5 semaines, jusqu'à être suffisamment grandes, ensuite transférées (le plus tôt est le mieux selon l'expérience); puis les plantes sont transférées à raison de 5 dans chaque pot à germination de dimension 9 cm x 9 cm. Ces plantes sont arrosées suffisamment et couvertes avec du plastique pour quelques jours, après leur transfert. Les plantes sont mises à croître dans des chambres jusqu'à l'exposition à l'ozone. Elles sont ainsi exposées à l'ozone au 21^{ème} jour (trois semaines de vieillesse). La sensibilité des plantes à l'ozone a été testée en fonction de l'âge, seulement avec les plantes jeunes (plantes qui ont 10, 14 et 24 jours d'âge), par conséquent il n'y a aucune différence à la sensibilité à l'ozone à cet âge. Il pourrait être

possible d'utiliser les plantes jeunes en cas d'urgence. Quoiqu'il serait conseillé de respecter les conditions (21 jours de vieillesse), en tout état de cause. Ainsi, il faudrait être attentif de ne pas utiliser les plantes trop vieilles. Les mutants *ozs2* ont la caractéristique de fleurir tôt et d'être sénescents prématurément 25-28 jours à peu près (une semaine avant la souche Col-0). Après le stade de rosette des feuilles, la sénescence avance rapidement (ce qui signifie que le métabolisme de l'éthylène sera fortement altéré).

Les plantes sélectionnées sont exposées à l'ozone **300 ppb**, durant **8h** de 9:00 à 17:00.

12. Préparation des extraits végétaux de *Phaseolus vulgaris*, *Conyza bonariensis*, *Arabidopsis thaliana*

Les feuilles fraîches ou décongelées (congelées dans l'azote liquide), sont pesées, taillées en morceaux et ensuite lavées à l'eau distillé. Nous avons utilisé un rapport de **1gr** de feuille pour **5 ml** de solution de tampon 66 Mm K-phosphate (pH 7.00) avec 100 Mm NaCl suivant la méthode de (Castillo et al. 1986) à 4°C. Les feuilles dans la solution sont homogénéisées avec l'Omnimixer TURAX à la vitesse de **8000 tours/mn** durant **1mn**. La solution homogénéisée a été filtrée à travers Miracloth (Calbiochem). La filtration est centrifugée avec le Rotor Beckman J2HS à la vitesse de **1 000 tours/min** pour **10 min**, à la température de 4 °C. Le surnageant est utilisé pour mesurer des activités enzymatiques.

Comme le matériel d'*Arabidopsis thaliana* est très petit, on a utilisé une autre méthode d'extraction des protéines.

En effet, les feuilles décongelées (conservées dans l'azote liquide à -70°C), sont pesées. On utilise un rapport de **1gr** de feuille pour **3 ml** de solution tampon 0.2 M Tris-HCl (pH 7.00), contenant 7.5% de PVPP polyvinylpyrrolidone (w/v) (See et al. 1992 II et IV). Le matériel est broyé dans un mortier avec un pilon, contenant du sable de mer stérilisé (aidant la rupture des cellules). Tout est mis dans un contenant avec de l'azote liquide à 4°C. La solution homogénéisée est centrifugée pour **10 min** à la vitesse de **1 000 tours/min**. Le surnageant est utilisé pour la détermination de l'activité ascorbate peroxydasique.

La détermination de la concentration des protéines solubles présentes dans l'extrait cellulaire est effectuée en utilisant la réaction quantitative, se faisant avec le Bleu de Coomassie. Interagissant avec les protéines avec des modalités encore pas du tout élucidées, cette substance vire du **brun** au **bleu**, formant un complexe avec un pic d'absorption à **595 nm**. Dans certaines limites de relation, il y a une linéarité entre la résultante de l'augmentation de l'absorbance et de la concentration protéique.

Le protocole suivi est décrit par (Bradford 1976).

Pour la préparation du réactif 100 mg de bleu brillant de Coomassie G250 sont dissous dans 50 ml d'éthanol 95%. A cette solution, sont ajoutés avec précision 100 ml d'acide orthophosphorique 85% (p/v), en maintenant une faible agitation. Après avoir porté le volume à 1 litre avec de l'eau distillée, la préparation, ainsi filtrée avec le papier Whatmann. Le mélange, ainsi obtenu peut être conservé à la température ambiante pour longtemps, utilisable.

Autrement, on pourrait aussi utiliser des solutions qui se trouvent dans le commerce (concentré d'essai de réactif de colorant de protéine Bio-rad 450 ue cat: 500-006)

13. Mesures spectrophotométriques des concentrations protéiques

A des portions d'aliqotes d'échantillon dont on veut déterminer la concentration protéique de volume compris entre 2 et 50 μl , on y ajoute 1 ml de mélange colorimétrique. Après au moins 15 minutes à température ambiante, l'augmentation de l'absorbance à 595 nm est mesurée au spectrophotomètre avec le témoin constitué de 1 ml de mélange colorimétrique à qui on ajoute un égal volume d'eau distillée ou du tampon, dans lequel la préparation est dissoute. La concentration des protéines est ainsi calculée par la moyenne de l'absorbance, pour un des divers échantillons sur la base d'une droite d'étalonnage construite, en procédant de la même manière avec des portions aliqotes de solution 0.5 mg ml⁻¹ de sérum albumine de bovin (BSA) contenant 0-5-10-15-20-30-40-60-80-100 μg de protéine.

Le schéma des opérations est le suivant:

1. Prendre 3 ml de solution Bio-rad pur;
2. Ajouter 12 ml d'eau distillée ;
3. Ainsi nous avons fait une dilution 1/5 ;
4. Filtrer et mettre 800 μl de ce mélange dilué dans chaque cuvette de plastique, suivant ce tableau du dessous **Tab.1**
5. Lire l'absorbance à la longueur d'onde 595 nm après 15 min. au spectrophotomètre Varyan Cary3.

BSA (μg)	5	10	15	20	30	40	60	80	100
BSA (μl)	10	20	30	40	60	80	120	160	200
dH₂O (μl)	190	180	170	160	140	120	80	40	0
Bio-rad (μl)	800	800	800	800	800	800	800	800	800

14. Détermination de l'activité de la SOD, utilisant le cytochrome c et la xanthine oxydase

L'anion O_2^- , un produit provenant de la réduction du dioxygène, serait une menace pour les cellules vivantes, s'il n'était éliminé par les super oxydases (EC 1.15.1.1). Cette famille des métallo enzymes contenant le cuivre et le zinc (Mc Cord, J.M., et Fridovich, I. 1969) ou le manganèse (Keele, B.B, Jr.,Mc Cord, J.M et Fridovich, 1970) ou le fer (Yost, F.J, Jr., et Fridovich, I. 1972), catalyse la conversion de O_2^- en $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, réaction qui a lieu à une vitesse qui s'approche à la limite de la diffusion. La littérature dédiée à ces enzymes se développe rapidement et est revue à intervalles de temps fréquents (Fridovich, I.1972, Fridovich, I 1986). Beaucoup de chercheurs se sont intéressés à l'activité de la SOD et c'est pourquoi tant d'essais variés ont été expérimentés pour démontrer l'importance d'un tel enzyme (Claucy R.M, Dahinden, C.A., et Hugli, T.E. 1984).

Malheureusement, il y a des problèmes apparemment qui altèrent les résultats de ces essais. Donc, il sera nécessaire d'examiner avec plus de précaution. Nous utiliserons l'essai basé sur la réduction du cytochrome *c* par la xanthine.

L'essai sur lequel, est réalisée l'activité de la SOD, utilise la réaction de la xanthine oxydase comme source de O_2^- , avec le cytochrome *c*, comme l'indicateur d'élimination de ce radical. Dans cet essai qui continue à être utilisé amplement, la SOD fait la compétition avec le cytochrome *c* par le flux de O_2^- .

Définition : Une unité de SOD a été définie comme la quantité d'enzyme impliquée dans l'inhibition de 50% sur la vitesse initiale de la réduction du cytochrome *c* dans les conditions suivantes:

50 mM Kpi, 0.1 Mm EDTA, 50 mM ferricytochrome, et suffisamment de XO (~ **6nM**), pour provoquer $\Delta A_{550} = 0.025/\text{min}$, à un **pH 7.80** et à la température de **25 °C**, dans un volume total de réaction de 3ml.

La compétition par O_2^- est au centre de cet essai. La SOD entre en compétition avec le cytochrome *c*, cependant que les deux compétassent avec la réaction de dismutation spontanée. N'importe quoi pourrait changer l'équilibre de cette compétition, par conséquent modifier le résultat de cet essai. Dans le commerce, le ferricytochrome *c* disponible, habituellement contient 5-20% de la forme ferro. Pour cela il serait impératif d'établir la concentration requise de ferrocyclochrome *c*, du stock de solution. Ceci peut être réalisé facilement, en utilisant le dithionite, comme réducteur en conjugaison avec des coefficients d'extinction molaire pour les formes ferri et ferro (Massey, V. 1959). Les échantillons qui contiennent une grande quantité de cytochrome *c*, dans la forme ferro pourraient être oxydés avec le ferricyanure et ensuite dialysés, avant leur utilisation. Ainsi, est demandée d'une certaine manière la concentration de ferricytochrome *c*, égale à 10 μM dans le mélange.

Parfois, le cytochrome *c*, est pollué avec la SOD. Quand, une telle chose arrive, c'est dû à la présence de Cu, ZnSOD inhibé par le CN^- , l'adjonction de 1 mM de CN^- au mélange de l'essai, diminuerait considérablement l'effet de la SOD endogène et provoquerait une augmentation dans la vitesse de réduction du cytochrome *c*. Ceci serait le diagnostic de la contamination avec la SOD. Comme le poids moléculaire du cytochrome *c* (~12.500), et du Cu, ZnSOD (~32.000) sont différents, ce problème serait résolu avec la purification du cytochrome *c*, à l'aide de la chromatographie sur gel de perméabilité.

Les XO provenant du commerce sont éventuellement pollués par les lactopéroxydases, qui peuvent catalyser l'oxydation du ferrocyclochrome *c* par H_2O_2 . Ceci, induirait une diminution progressive de la vitesse d'accumulation du ferrocyclochrome *c*, cependant du H_2O_2 s'accumule dans le mélange de l'essai. L'adjonction des catalases pour empêcher l'accumulation de H_2O_2 pourrait être une solution d'un tel problème, mais la catalase utilisée devrait être libre de toute la contamination de la part de la SOD (Halliwell, B. 1973).

La xanthine oxydase native ne réduit pas directement le cytochrome *c*, mais le fait seulement à travers l'action d'un médiateur de transfert électronique. Quand l' O_2 est seulement l'unique

accepteur d'électrons présents, dans le cas où l' O_2^- fait liaison dans la réduction du cytochrome *c* et les 100 % de cette réaction seraient inhibés par la SOD. Les quinones et certains colorants peuvent être aussi des médiateurs du transfert d'électrons de la XO jusqu'au cytochrome *c* (Mc Cord, J.M., et Fridovitch, I. 1970) et de tels composants peuvent être dans des extraits crus à essayer où les inhibiteurs putatifs de la SOD sont testés. Dans le cas de la présence de tels composants, une partie de la réduction du cytochrome *c* pourrait être due aux quinones, par ce que toute la réduction ne serait faite par la SOD.

La déflavination de la XO est aussi une autre source d'erreur. Pour cela la deflavo XO peut réduire le cytochrome *c* directement, ceci aussi dans les rigoureuses conditions d'anaérobie. Congeler et décongeler répétitivement ou exposer à des concentrations élevées de sel peuvent enlever à la XO, sa FAD (Komai, H., Brady F. O. Rajogopalan, K. V., et Handler, P. 1972). La XO préparée suivant (Waud et al. 1975) est initialement libre de la forme deflavo, peut aussi être testée ainsi de suite durant le dépôt prolongé, pour assurer si la réduction de tout le cytochrome *c*, qui soit catalysée pourrait être inhibé par la SOD.

De toutes les façons, la SOD se signale par sa présence à inhiber la réduction du cytochrome *c* par la XO, parce que quelque chose qui inhiberait directement la XO peut être confondue à la SOD. Ceci, serait un piège seraient tombés beaucoup de chercheurs. Un cas survient quand le NaF est utilisé pour ajuster la force ionique des essais de la SOD (de Freitas, D. M, et Valentine, J.S.1962). NaF impose une inhibition progressive de la réduction du cytochrome *c* par la XO. C'est ainsi que d'autres sels puissent avoir le même effet que la XO, comme par exemple $NaClO_4$, $NaNO_3$, etc. En antithèse avec la SOD, il n y a aucun effet sur la réaction avec la XO.

Le Tris inhibe faiblement la réduction du cytochrome *c* par la xanthine oxydase (Fridovich. I, et Hander, P. 1962) et puis ont été établis des problèmes de ce genre avec des tampons contenant des autres amines.

Le cytochrome *c* est chargé positivement à pH 7.80, cependant la Cu, ZnSOD bovine est chargée négativement au même pH et a un groupement (cluster) de charge négative, dans la région du site actif. (Getzoff, E.D., Tainer, J.A. Weimer, P.K., Kollman, P.A. Richardson, J.S., et Anderson; D.C 1983, Klappen, I. Hagstrom, R., Fine, R., Sharp, K., et Anderson; D.C 1983, Klappen, I., Hagstrom, R., Fine, R., Sharp, K., et Honig, B. 1986). De conséquence, la réaction d' O_2^- , avec à la fois ces protéines, est facilitée par des champs électrostatiques. En cas d'augmentation de la force ionique, la réaction n'a pas lieu. (Cudd, A. et Fridovich, I. 1982). Les effets parallèles de la force ionique sur les réactions d' O_2^- avec le cytochrome *c* et aussi avec la Cu, CuSOD bovine et la compétition entre ces protéines avec l' O_2^- , tend à minimiser les effets de la force ionique de l'essai. Cependant, ces effets ne sont pas semblables pour les SOD d'origines diverses, qui pourraient avoir des points isoélectriques différents, dépendant du pH. De ce fait, les effets latents de la concentration de sel dans cet essai devraient être toujours tenus en nette considération.

Un artéfact indéfini est crée par les composants qui peuvent réagir avec l' O_2^- , fournissant des produits qui pourraient à leur tour, réduire le cytochrome *c*. De tels composants auraient des

effets à se substituer à l' O_2^- , qui devrait être éliminé par la SOD, pendant que ceux ci resteraient les mêmes. Par conséquent, ces composants ne changent pas la vitesse de réduction du cytochrome *c* dans la réaction avec la XO, mais facilitent la réduction moins sensible à l'inhibition par la SOD. Ainsi, la SOD semble moins efficace quand de tels composants seraient présents, montrant l'impression d'inhiber la SOD. L'acide palmoïque a été identifié comme un tel inhibiteur et a été découvert d'influencer l'essai, mais n'avait aucun effet sur la SOD. Dès lors, le palmoate est oxydé par l' O_2^- en un produit qui pourrait à son tour réduire le cytochrome *c* (Hassan, H.M, Dougherty. H et Fridovich, I. 1980). Les chinones qui pourraient être réduites par l' O_2^- en semi-chinones, ayant la capacité de réduire le cytochrome *c*, qui montreraient ainsi ces effets (Buttler, J., et Hoey, B.M. 1986, Wintesbourn, C.C.1982).

L'activité de la SOD est mesurée au spectrophotomètre à **550 nm** durant **5 min**, utilisant la méthode de la Xanthine oxydase-Cytochrome *c* de Mc Cord, JM Fridovich (Mc Cord JM and Fridovich I.1969). L'essai a été réalisé à 25°C dans 1 ml de tampon phosphate (pH 7.80 ; 50 mM K_2HPO_4 + mM KH_2PO_4) ; 30 10^{-6} M Cytochrome *c* ; 0.1mM EDTA et 0.15 mM Xanthine (qui se dissout dans un peu de NaOH). On y ajoute des doses croissantes d'extraits protéiques successivement : 5 μ l, 10 μ l etc. et voyons pour quelle dose, nous avons 50% d'inhibition. La cuvette se colore en **rose**.

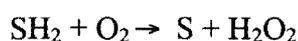
14.1 Détermination de l'activité de la POD

Le terme de peroxydase (POD), dans sa signification la plus ample, inclue un groupe d'enzymes spécifiques comme la NAD-POD, les POD des acides gras, la cytochrome-POD, l'Iodure-POD, comme ainsi les enzymes non spécifiques de diverses origines, qui sont simplement connus comme POD (donateur : H_2O_2 -oxydoréductase, EC 1.11.1.7).

Les POD catalysent la déshydrogénation d'un grand nombre de composés aromatiques comme les phénols, les hydro quinones e les amino hydroquinones, et ceux dérivés de la benzidine. En particulier, le 2-crésol, le gaïacol, le pyrogallol, l'acide homovanillique, l'hydro quinone, la 1,2 e la 1,4-phényle di amine, le vert de leuco malachite, le 2,6 dichloro phényl indo phénol, le 4,4'-diamine di phényle amine, le propionyl (J.Pütter 1977), la benzidine, l'otoluidine, la di-o-anisidine et ses dérivés.

Les POD (EC 1.11.1.7) sont des hèmes-protéines, parmi peu d'exception ; la réaction normale des peroxydases consiste dans le transfert de l'hydrogène ou des électrons du donateur vers le H_2O_2 .

Les POD peuvent agir comme **oxydases** :



Ou bien comme des **mono oxygénases** :

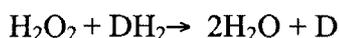


C'est possible l'introduction indirecte d'un atome d'oxygène à l'intérieur d'une molécule de substrat (J. Pütter 1977). D'autre part, les réactions peroxydasiques pourraient être catalysées

par les catalases avec certains substrats, par ex., les phénols, les alcools et quelques composés inorganiques ; comme l'hémoglobine et quelques produits de crise de nerf qui réagissent avec les substrats typiques de la POD. Finalement, dans certains cas des oxydases, la POD pourrait utiliser le H_2O_2 , comme source d'oxygène. Pourtant, dans les réactions classiques des POD, la spécificité du donateur d'hydrogène est très basse, par contre est plutôt élevée la spécificité pour le peroxyde. Il semble que, excepté le H_2O_2 , les seuls composants qui portent le groupe - OH, par ex. l'acétyl, le méthyle et l'éthyle hydro peroxyde, pourraient servir de substrats.

1. Les hème-protéine POD, se trouvent dans les animaux, dans les plantes supérieures, comme le raifort, l'ananas, le figuier, la patate, les légumes, dans les racines du blé et du tabac, dans les levures, les champignons et les bactéries. Une des POD, mieux étudiée, est celle du raifort. Chez les mammifères, les POD se rencontrent dans les leucocytes, dans le lait, le foie, la rate, l'utérus, dans les glandes salivaires, la paroi intestinale, dans les poumons etc.. Ces peroxydases sont aussi trouvées dans le cytoplasme des cellules des mammifères, dans les mitochondries, des microsomes et probablement (J Pütter 1979).

La réaction de la POD consiste en deux stades suivants, chacun implique un atome de H ou un électron. On ne peut pas formuler une équation de la réaction générale catalysée par la POD, parce que le parcours de la réaction dépend du type de substrat. Dans le cas le plus simple, la même molécule serait l'hydrogène donateur (DH_2), pour l'un et l'autre des deux stades. Par conséquent, l'équation de la réaction globale serait habituellement :



Dans plusieurs cas, l'intermédiaire DH_2 est en général mesurable.

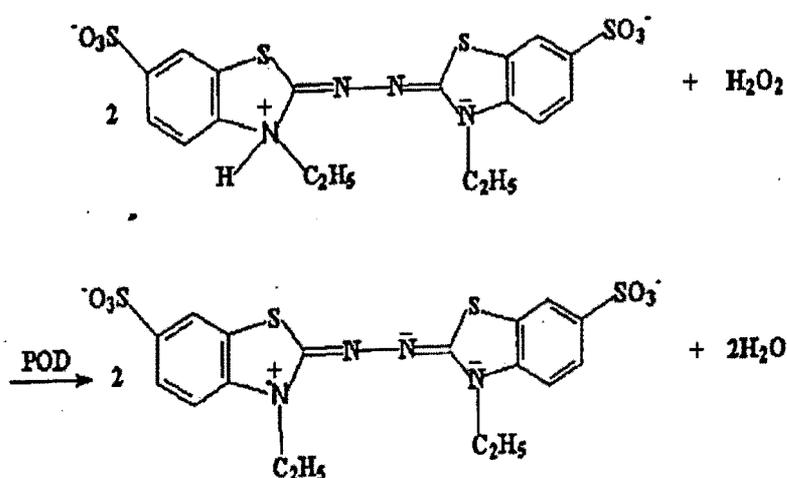
Souvent les radicaux intermédiaires induisent des réactions secondaires. L'oxydation peroxydative du gaïacol, le substrat typique de la POD (J Pütter 1977), détermine quelques problèmes, parce que plus d'un composant résulte de la déshydrogénation (H. Booth, B.C. Saunders.1956). Dans le cas de l'ABTS, la soustraction d'un électron donne un produit final stable (voir après).

Les cinétiques des diverses POD ne sont pas uniformes. Généralement, on peut définir une constante de *Michaelis* de la H_2O_2 qui est dépendante de la concentration du donneur. Pourtant, dans le cas de l'A.B.T.S, on peut trouver un K_m mesurable qui dépend de la concentration du donneur, cependant la vitesse est fortement influencée par la variation dépendante de la concentration du H_2O_2 .

Principalement, l'activité de la POD pourrait être déterminée par la diminution de H_2O_2 de l'hydrogène donneur, ou de la formation du **composé oxydé**. Surtout si la troisième méthode a été appliquée et que les substrats variés ont été utilisés. Des valeurs validées ont été obtenues avec le di-o-anisidine, mais l'usage de ce composé est limité à cause de son potentiel d'action carcinogénique. Ensuite le gaïacol est requis comme substrat, toutefois une incertitude existait à propos du produit de la réaction (J Pütter 1975). Une nouvelle substance originalement introduite par la détermination du glucose sérique, **l'acide 2,2'-azino-di-[3-**

éthyl-benzotiazoline (6-sulfonique)] (K. Gawehn, H. Wielinger, W. Werner 1970), donne de bons résultats dans la détermination de la POD et de l' H_2O_2 (J Pütter 1975, W.Werner, H.-G.Grey, H.Wielinger 1974, H.Gallati 1979).

Les hormones puissent quelques fois influencer in vivo l'activité des POD, spécialement dans les tissus hormono-dépendantes ; certains produits médicaux peuvent diminuer leur activité. Dans quelques cas d'empoisonnement, on observe une diminution de l'activité de cette enzyme. D'habitude, les tumeurs malignes ont une activité de la POD plus basse que dans les tissus sains. Le cyanure inhibe toutes les activités POD ; cette inhibition pourrait être utilisée pour identifier une " vraie" activité de la POD.



Selon cette équation, **Fig.10** il se forme un radical cationique ($ABTS^+$), stabilisé par résonance (W.Werner, H.-G.Grey H. Wielinger1970, K. Becker. 1974), si on utilise un excès de substrat. Dans d'autres conditions, (pH bas, excès de H_2O_2), la réaction pourrait se dérouler en formant un di-cation ; la quantité d' $ABTS^+$ serait ainsi proportionnelle à la disparition de H_2O_2 , (R. Becker 1974). Il a été établi que la vitesse de la réaction se différencie parmi les différents donneurs. Cependant l'expression de l'activité de la POD en termes de μ mole de substrats convertis par unité de temps ne devrait pas être généralisée : mais n'est validée que dans un cas particulier de conditions optimales.

Les conditions optimales des mesures d'activité de POD (R. Becker 1974).

La concentration du substrat à pH 6.00 en présence de 2×10^{-3} moles d'ABTS par litre, la K_m pour la H_2O_2 est de 3.3×10^{-5} moles/l, avec 10^{-3} moles de H_2O_2 , la K_m de ABTS est 3.65×10^{-3} moles/l. Dès lors dans les conditions de l'essai, la saturation avec ABTS ne pourrait pas se réaliser. Toutefois avec la concentration de 2×10^{-3} moles/l, la diminution de la concentration durant le temps de réaction est près petite, pour être négligée, parce que la réaction devrait être considérée avoir une allure linéaire. Dans les conditions de concentration de H_2O_2 plus élevées égales à 10^{-3} moles par litre, l'activité enzymatique pourrait être influencée.

La POD de raifort et les POD des mammifères, comme les POD du lait, se différencient pour leur pH optimal. Le pH 6.00 est requis, parce que la POD du raifort et celle du lait pourraient être mesurée avec de bons résultats.

La température de 25° est bonne pour la POD du raifort, comme pour celle du lait ; les facteurs de conversion de la température ne pourraient pas être des données en général, par ce que les POD d'origines diverses se différencient par rapport à cela.

Durant l'évolution de la réaction, il se passe une certaine décroissance dans l'activité enzymatique, qui résulte être dans les temps requis (5min), moins de 5%. L'absorbance optimale de l'ABTS⁺ à 420 nm ; des mesures à 405 nm sont nécessaires de façon à pouvoir utiliser des spectrophotomètres ordinaires. Le spectrophotomètre ou le photomètre à ligne spectrale capable de mesures exactes à 405 nm de préférence équipée d'une cuvette thermostatique, d'un bain Marie, d'un enregistreur et d'un chronomètre à déclencheur.

La pureté des réactifs, l'ABTS et la H₂O₂, ne devraient pas contenir de métaux lourds. Seul l'ABTS, hautement purifié nécessiterait à être utiliser. Aussi la POD ne devrait pas contenir des catalases.

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déionisée.

1. Solution de ABTS (2.10-2 mole/l) : dissoudre 1.1 gr d'ABTS (sel de diammonium) dans 100 ml d'eau contenant 0.067 mole/l de phosphate buffer à pH 6.00 (Sörensen ; 0.144gr Na₂HPO₄.2H₂O + 0.798 gr KH₂PO₄ dans 100 ml d'eau).

2. H₂O₂ (10⁻² mole) : diluer une solution commerciale à peu près de 10 mole/l pour obtenir une solution 0.1 mole/l. Faire la titration de ce stock de solution avec une solution de KMnO₄ et puis diluer jusqu'à obtenir 10⁻² mole/l (la solution de KMnO₄ est titrée une fois la semaine avec l'acide oxalique).

3. POD (pour le but de la calibration) : dissoudre la POD lyophilisée extraite des racines de raifort de haute pureté (à peu près 250 U/mg) dans du tampon phosphate à différentes concentrations (voir solution 1).

La stabilité des solutions : la solution de ABTS, dissoute est oxydée lentement à la température du laboratoire en présence d'oxygène. Essentiellement, aucune croissance de l'absorption n'advienne durant une période de 10 heures.

La solution de H₂O₂ : solution diluée devrait être préparée quotidiennement à partir de la solution de stock. Ceci devrait être contrôlé à travers la titration une fois la semaine.

Les solutions de POD : la POD de raifort perd 10% de son activité journalière en chambre et à la température de (20 °C) ou à 3°C ; parce que, les solutions standard devraient être préparées avant chaque essai. Des pertes d'activité sont enregistrées dans la POD du lait de commerce, durant 1 heure de dépôt à 20°C, pour une valeur de 20 % ; toutefois à 3 °C, la stabilité pourrait être améliorée. La solution de POD des mammifères devrait être conservée à 0-4°C et à tester au plutôt.

La méthode de récolte dépend du type de matériel. Le sang devrait être libéré des organes des animaux d'expérience. Les fluides ne requièrent aucun traitement particulier. Les tissus sont homogénéisés dans un tampon phosphate à **pH 6.00**, avec une homogénéisation *Potter Elvehjem*. Il faut se référer aux méthodes appropriées pour la détermination des fractions cellulaires particulières (cf. Vol. II, Chapitre 1.2.2.4, p.38). En ce qui concerne les suspensions des particules subcellulaires (cf. Vol. II, Chapitre 1.2.3, p.49), elles pourraient être ajoutées directement dans la cuvette. Tous les échantillons ont été dilués avec précaution avec le tampon phosphate à pH 6.00.

Cette opération dépend de la situation et du type de POD à tester. De toute façon, il serait conseillé d'opérer dans l'intervalle de 0 - 4°C, durant l'utilisation et le dépôt de l'enzyme. Si la stabilité de l'enzyme n'était pas assurée, le test devrait être réalisé après une heure de récolte de l'échantillon.

Pour les détails des mesures dans les tissus : la totalité de l'activité de la POD dans les cellules est quantitativement extraite du tissu, seulement après une **complète homogénéisation**, parce que l'enzyme peut rester potentiellement dans toutes les fractions de cellule (J. Pütter 1979).

La longueur d'onde est de 405 nm, dans une cuvette de 1 cm à un volume finale de 2.4 ml ; 25°C (de préférence dans un contenant de cuvette thermostatique). Les mesures sont réalisées en fonction du témoin (le blanc) contenant l'ABTS et H₂O₂ **sans enzyme**. Avant de commencer l'essai, ajuster les températures des solutions à 25°C.

L'activité des peroxydases totales est suivie au spectrophotomètre à **405 nm** durant **5min**, partant de **1 à 6 min**. Le principe est basé sur l'oxydation du composé ABTS au cation ABTS⁺ de la part du H₂O₂ de (J.Pütter 1979 et Becker 1974), réaction catalysée par la présence des peroxydases (POD). Le pH de réaction peut varier suivant le type de peroxydase. L'essai est réalisé à **25°C**, dans un milieu de **900 µl** de tampon pH : 6.00 (0.114 gr Na₂HPO₄.2H₂O + 0.798 gr KH₂PO₄ dans 100 ml H₂O), 100 µl H₂O₂ 10⁻²M, 100 µl ABTS 2mM et presque 20 µl d'extrait protéique. La réaction colorimétrique est **verte**, avec une augmentation d'absorbance, qui se déroule de façon **linéaire** jusqu'à la valeur de **2.00**. De cette formule on obtient l'activité :

$$\text{en nkat/l : } 537.6 \times \Delta A / \Delta T$$

$$\text{en U/L : } 32.26 \times \Delta A / \Delta T$$

ou utilisant $\epsilon = 1.86 \times \text{mM}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$.

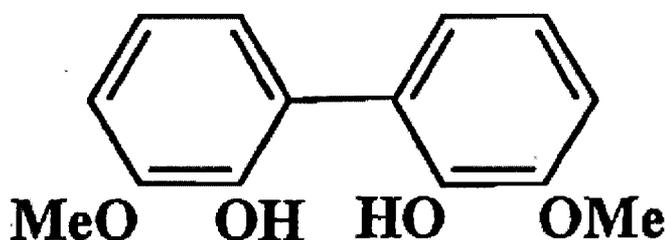
14.2 Détermination de l'activité Gaïacol peroxydase

Beaucoup de chercheurs, par ex. (A.N Bach & R. Chodat 1916) ont remarqué que le gaïacol est oxydé par le système peroxydasique, donnant en premier lieu un composé **rouge**. (H. Ucko et H. W.Bansi 1926) ont donné le pH optimum pour la réaction autour de 5-5.2 ; (B.Chance 1949) a toute fois découvert que la vitesse de la réaction du "composé II", avec le

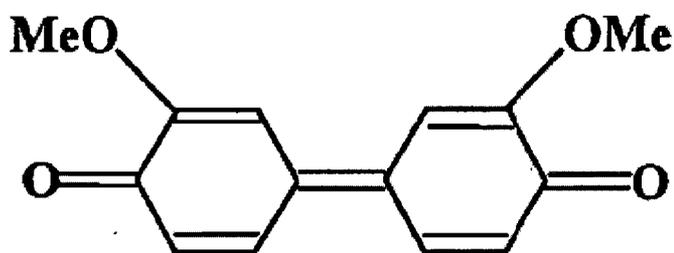
gaïacol est influencé un peu par le pH dans l'intervalle 3.4 – 5.3. Beaucoup de scientifiques ont utilisé cette réaction avec le gaïacol, pour étudier la cinétique de l'activité peroxydasique.

Par conséquent, il serait important de faire des investigations avec beaucoup de précaution de cette réaction souvent utilisée (H. Booth et B.C 1956). Quand cette solution de gaïacol dans un tampon acétique (pH : 5.00), est traitée avec le peroxyde d'oxygène et la peroxydase, le produit se colore en **rouge brique** avec un lustre métallique.

Quand le produit cru est sublimé sous vide, un solide blanc est isolé, cristallisant dans un solide à couleur unique.



Une autre synthèse prouve que ce produit est le 2,2'-dihydroxy 3,3'-métoxybiphényle. **Fig.11**. Quand un produit cru oxydé par le gaïacol est réchauffé avec l'anhydride acétique, l'on obtient dans une poudre de zinc et de l'acétate de sodium, un solide morbide blanc. De la sublimation fractionnée, on obtient des cristaux incolores sans 4,4'- diacétoxy-3,3-dimétoxybiphényl. L'isolement de ce diphényle ayant lieu avec acétylation réductrice du produit d'oxydation cru, prouve que ce dernier produit contienne le 3,3'- dimétoxydiphénol-4,4-quinone **Fig.2**.



La caractéristique couleur rouge brique du produit de l'oxydation du gaïacol cru est due sans doute surtout à cette **quinone**. Le produit cru pourrait ainsi contenir de petites quantités de l'isomère 3,3'- dimétoxydiphénol-2,2-quinone, après une oxydation poussée de l'hydroxybiphényle.

Le fait que cette oxydation du durénol fournisse un produit incolore serait du aux effets stériques des quatre groupes o-méthyle. Une oxydation poussée du bi phényle à un di phénoquinone coloré requerrait ainsi une double liaison à travers les deux anneaux, et ceci provoquerait ainsi une diminution de la longueur d'onde de la liaison. Un modèle a comparé qu'une telle structure planaire serait invraisemblable.

L'activité GaaPX (E.C.1.11.1.7) est suivie au spectrophotomètre à **470 nm** à un temps égal à **3 min**, avec une augmentation de l'absorbance due à la **polymérisation** du gaïacol dans un milieu de **50 mM NaH₂PO₄** (pH 6.10) ; **16 mM Gaïacol** ; **2 mM H₂O₂** et **10 µl** d'extrait protéique (Castillo et Greppin 1986). La cuvette se colore en **rouge brique**.

14.3 Détermination de l'activité de l'ascorbate peroxydase

Pour déterminer l'activité de l'ascorbate, il nécessite la préparation des solutions.

1. 0.50 mM d'acide ascorbique ;
2. 0.10 mM H₂O₂ ;
3. 1 mM d'EDTA ;
4. 0.1 M de Hepes-KOH. pH : 7.80

Prendre une solution 0.1M, ajoutant de l'eau distillée à un volume final de 50 ml ;

Ajuster le pH à 7.80, avec le KOH ;

Prendre 100 µl de la solution stock de EDTA 0.5M, la mettre dans la de buffer à mélanger à mélanger ;

Utiliser une solution stock de H₂O₂ 8.82M (30%).

Prendre 10 µl de H₂O₂ 8.82M et mettre dans 8.82 ml d'eau distillée, ainsi on obtient une solution stock de As. AC 1M ;

Prendre 10 µl de As. Ac 1M et les mettre dans 9.990 d'eau distillée.

L'activité APX : L'oxydation de l'ascorbate est suivie avec la diminution de l'absorbance à **290 nm** ($\epsilon = 2.8 \times \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Luwe *et al.* 1993) durant **10 min** (pour les extraits végétaux de haricot et de conyza) ou **5 min** (pour les extraits végétaux d'arabidopsis), dans une solution de 0.5 ml de buffer Hepes-KOH (pH 7.80) ; 0.1 mM de EDTA ; 0.5 mM d'acide Ascorbique et presque 20 µl d'extrait protéique de (haricot ou de conyza) ou presque 5 µl d'extrait protéique de (arabidopsis), dans une cuvette de quartz.

14.4 Détermination de l'activité de la Syringaldazine

Beaucoup d'enzymes sont impliqués dans les processus de lignification (Gross 1980). Les peroxydases (EC 1.11.17) agissent dans l'ultime étape de la biosynthèse de la lignine, par exemple dans la polymérisation des cinamides alcools substitués en présence des peroxydes d'hydrogène (Harkin et Obst 1973). La formation du peroxyde d'hydrogène de la NADH, pourrait ainsi se faire par l'entremise des peroxydases des parois cellulaires. (Elstner et Heupel 1976, Gross *et al.* 1977). Dès lors, il est d'un certain intérêt de déterminer la nature et les propriétés des iso peroxydases impliquées dans la polymérisation des monomères de la lignine.

Les peroxydases pourraient être reconnues avec l'usage simultané des techniques histochimiques et biochimiques. Dans la première étape, on pourrait utiliser un substrat spécifique des peroxydases, impliquées dans les processus de lignification où la syringaldazine (Harkin et Obst 1973), qui a une affinité spéciale pour lignifier les peroxydases des parois cellulaires (Cateson *et al.* 1978). Dans l'ultime étape, le développement de l'activité des peroxydases pourrait être suivi dans les différents tissus lignifiés durant les périodes de dormance et de lignification.

L'activité Syr.PX. L'augmentation de l'absorbance est enregistrée à **530 nm** (Pandolfini, T. Gabrielli, R et Comparini, C. 1992), pour un temps égal à **5 min** dans un milieu de 200 mM Na-K phosphate (pH 6.00); 2.5 mM H₂O₂; 2 mM Syringaldazine dissout dans du méthanol /dioxane : 1v/1v et à peu près 50 µl d'extrait protéique de haricot.

RESULTATS

15. Recherche des bases moléculaires de la résistance : le haricot Pinto-Groffi

Nous avons utilisé ce modèle pour examiner la réponse différentielle des individus sensibles et résistants à doses subléthales d'ozone. L'étude est basée sur le monitoring de quelques activités essentielles parmi lesquelles la SOD et les POD dans un arc de temps de 96 heures successives à l'exposition à l'ozone.

15.1 Activité des peroxydases

Nous avons enregistré un certain nombre d'activités peroxydasiques dans les feuilles d'haricot exposées à l'ozone. Précisément, nous avons enregistré :

1. *Péroxydases totales* ;
2. *Gaiacol peroxydase* ;
3. *Ascorbate peroxydase* ;
4. *Syringaldazine peroxydase* ;

Ces activités illustrent différentes fonctions métaboliques des plantes : APX est principalement une enzyme antioxydante, impliquée dans la cascade de Halliwell-Asada ; GuP_x est responsable du métabolisme des composés phénoliques, SyrPX est impliqué dans les mécanismes de lignification.

Dans les conditions normales, les activités des peroxydases déterminées après l'homogénéisation et l'extraction des protéines, sont comparables dans les cultivars ozone-résistant et ozone-sensible. La seule exception est l'ascorbate peroxydase : l'activité dans le cultivar ozone sensible. Dans le cas d'activité des peroxydases, il y avait une légère augmentation enregistrée dans le cultivar ozone tolérant (20-30%) **Fig.13A**

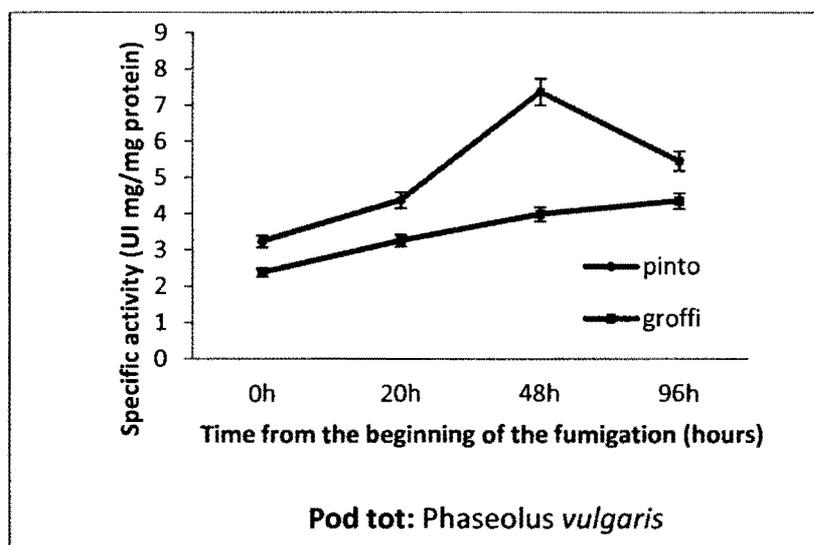


Fig. 13A : Activité Peroxydase totale en fonction du temps d'exposition à l'ozone

Tab. 2 : Peroxydase total (AS : UI / mg)

PX tot Pinto	0h	20h	48h	96h
	3.60	4.44	7.72	5.04
	3.18	4.92	6.96	5.28
	2.94	3.78	7.44	6.06
Contrôle	2.28	2.35	2.56	3.00
	2.40	2.80	2.66	2.70
	2.76	2.48	2.55	2.67

Tab. 3 : Peroxydase totale (AS : UI / mg)

PX tot Groffi	0h	20h	48h	96h
	2.52	3.54	3.78	4.14
	2.34	3.18	4.02	4.38
	2.28	3.06	4.16	4.56
Contrôle	1.56	1.80	1.75	2.10
	2.04	1.67	1.86	1.98
	1.86	1.76	2.00	1.87

L'exposition à l'ozone pour **4 heures**, à **120 ppb**, provoque une croissance remarquable de l'activité des peroxydases dans le cultivar ozone sensible. Cet effet est plutôt lent au début, et rejoint le maximum seulement après **48-96 heures**. Des variations importantes sont observées pour SyrPx, GuPx et APx, qui montrent des augmentations jusqu'à 4-6 fois. Au contraire, des effets assez petits sont observés dans le cultivar ozone tolérant **Fig.14A**.

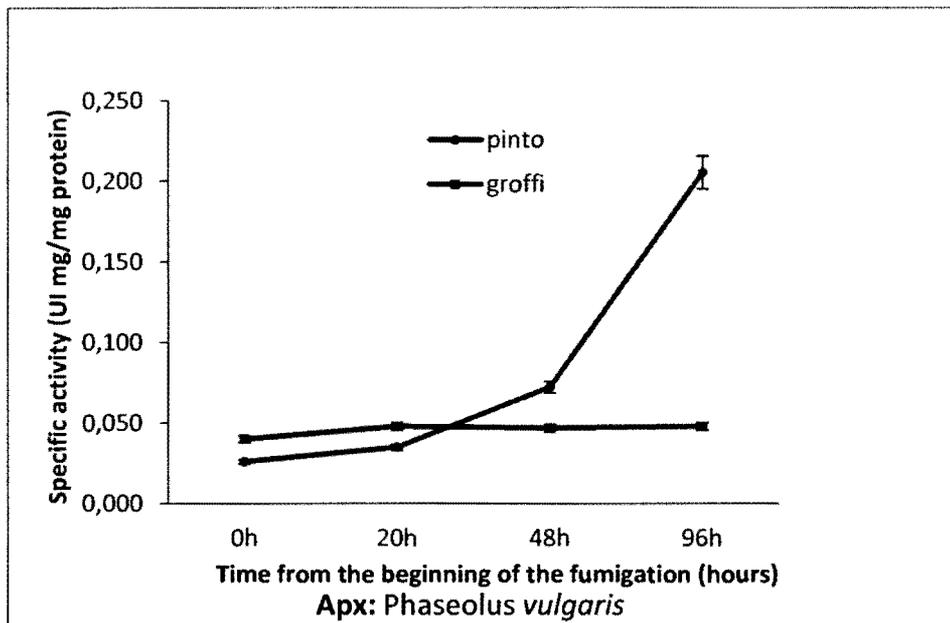


Fig. 13B : Activité Ascorbate peroxydase en fonction temps d'exposition à l'ozone

Tab.4 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg)

APX Pinto	0h	20h	48h	96h
	0.018	0.028	0.082	0.226
	0.034	0.042	0.075	0.200
	0.026	0.035	0.060	0.19
Contrôle	0.015	0.018	0.030	0.022
	0.017	0.014	0.023	0.030
	0.021	0.027	0.03	0.028

Tab. 5 : (AS : UI / mg)

APX groffi	0h	20h	48h	96h
	0.030	0.038	0.048	0.055
	0.047	0.051	0.053	0.041
	0.043	0.056	0.040	0.047
Contrôle	0.035	0.028	0.032	0.040
	0.030	0.031	0.029	0.037
	0.029	0.027	0.025	0.038

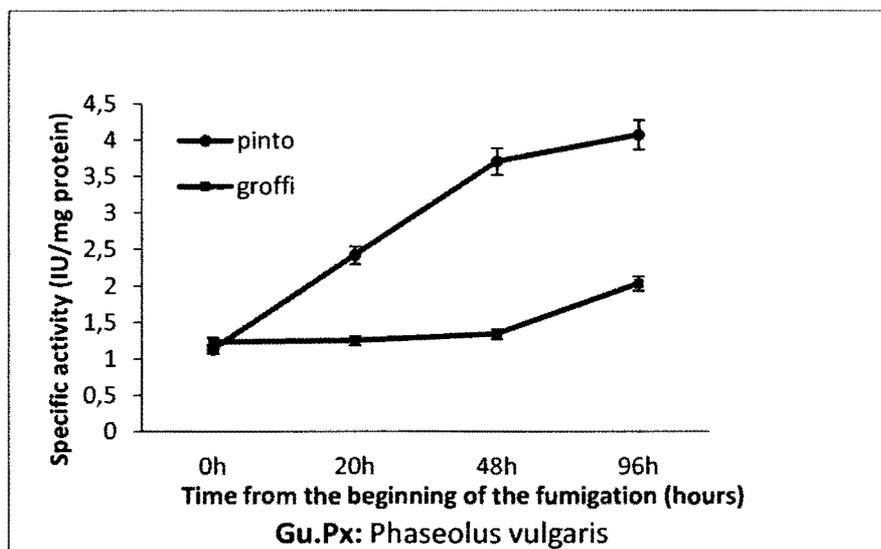


Fig. 13C : Activité Gaïacol peroxydase en fonction du temps d'exposition à l'ozone

Tab.8 : Gaïacol peroxydase (AS : UI / mg)

GuPx Pinto	0h	20h	48h	96h
	1.23	2.37	3.85	4.26
	1.12	2.4	3.65	4.00
	1.09	2.50	3.60	3.95
Contrôle	0.96	0.89	0.90	0.80
	0.91	0.80	0.83	0.93
	0.99	0.92	0.87	0.79

Tab.9 : Gaïacol peroxydase (AS : UI / mg)

GuPx Pinto	0h	20h	48h	96h
	0.3	0.59	1.13	1.33
	0.28	0.67	1.05	1.20
	0.33	0.61	1.24	1.47
Contrôle	0.26	0.30	0.42	0.36
	0.25	0.35	0.36	0.40
	0.31	0.28	0.29	0.32

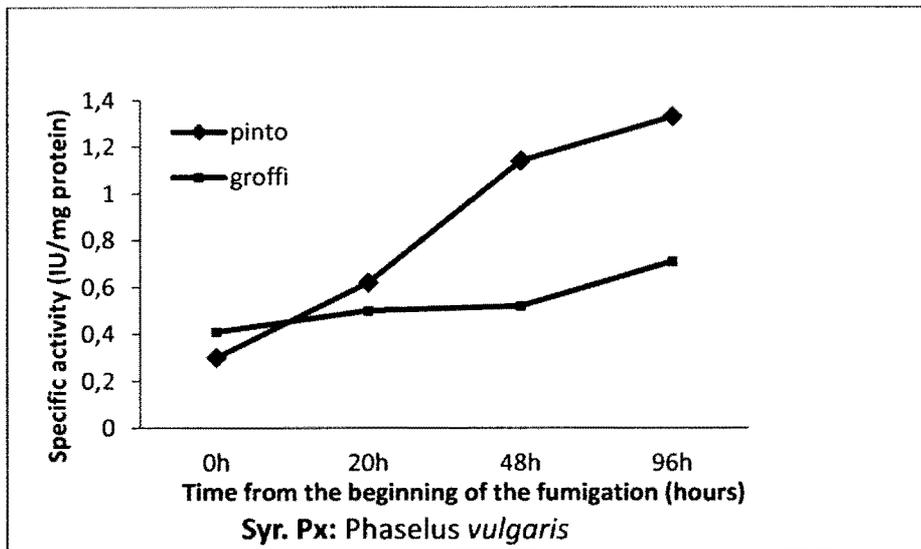


Fig. 13C : Activité Syringaldazine peroxydase en fonction du temps d'exposition à l'ozone.

Tab.8 : Syringaldazine peroxydase (AS : UI / mg)

SyrPx Pinto	0h	20h	48h	96h
	0.3	0.59	1.13	1.33
	0.28	0.67	1.05	1.20
	0.33	0.61	1.24	1.47
Contrôle	0.25	0.30	0.42	0.36
	0.25	0.35	0.36	0.40
	0.31	0.28	0.29	0.32

Tab.9 : Syringaldazine peroxydase (AS : UI / mg)

SyrPx Groffi	0h	20h	48h	96h
	0.44	0.54	0.58	0.75
	0.48	0.47	0.53	0.67
	0.30	0.50	0.45	0.70
Contrôle	0.44	0.40	0.38	0.45
	0.42	0.39	0.36	0.37
	0.36	0.35	0.37	0.32

15.2 Activité de la superoxyde dismutase

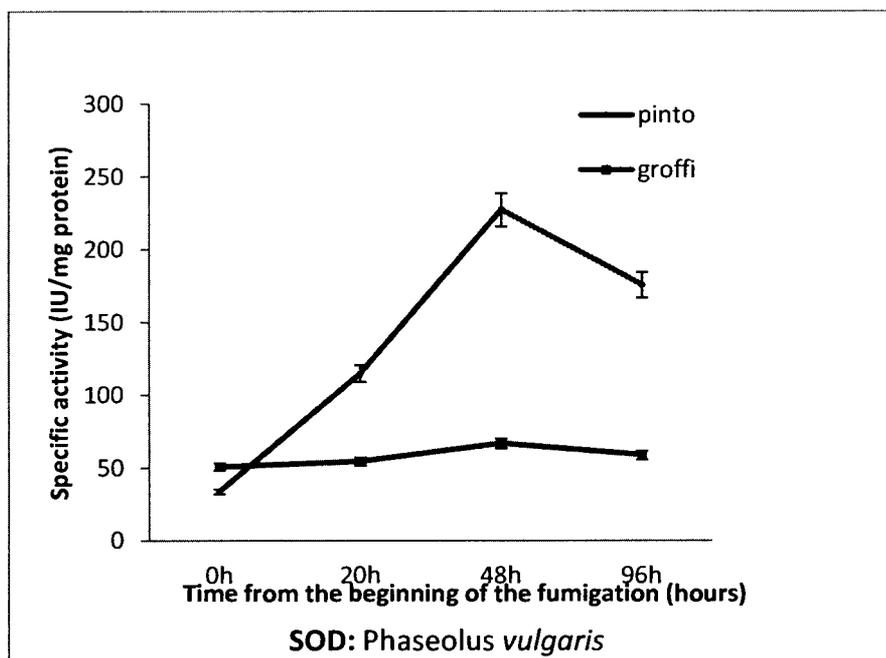


Fig. 14 : Activité Supéroxyde dismutase en fonction du temps d'exposition à l'ozone

Tab.10: Supéroxyde dismutase (AS: UI/ mg)

SOD Pinto	0h	20h	48h	96h
	26	114	232	175
	35	121	230	170
	41	110	220	182
Contrôle	19	23	28	43
	25	38	39	37
	32	36	37	36

Tab.11: Supéroxyde dismutase (AS: UI/ mg)

SOD Groffi	0h	20h	48h	96h
	45	53	68	62
	48	49	58	50
	60	62	75	65
Contrôle	45	52	48	42
	46	49	51	49
	50	55	53	48

16. Recherche des bases moléculaires de la résistance : *Conyza bonariensis*

Le paraquat est un herbicide de contact, non sélectif avec une rapide action desséchante due au dommage sur la membrane. L'action du paraquat simule un stress de type

oxydatif. Nous avons voulu cependant établir s'il pouvait exister une résistance croisée entre stress dû à l'ozone et stress dû au paraquat. En d'autres termes, nous avons voulu établir, si des individus résistants au paraquat pourraient être plus résistants à l'ozone que des individus sensibles au paraquat. La mise en évidence de résistance croisée pourrait signifier que les mécanismes biochimiques qui portent à la résistance au paraquat sont capables de réduire la toxicité à l'ozone ; au niveau moléculaire cette observation cette observation signifierait que le stress oxydatif dans le cas de l'ozone et du paraquat suivent la même voie biochimique.

La plante adaptée pour un tel type d'études est *Conyza*, une plante herbacée dans laquelle sont notées des espèces résistantes et sensibles au paraquat. Nous avons pourtant analysé une série de paramètres biochimiques dans *Conyza* (précisément les peroxydases totaux, la gaïacol peroxydase, l'ascorbate peroxydases et la superoxyde dismutase), soit suite à l'exposition au paraquat, qu'à l'ozone. Une analyse macroscopique de la plante exposée au stress nous a permis encore d'établir que la résistance à l'ozone, indiquant que l'itinéraire d'invasion du dommage suite aux deux types de stress est divers. Les résultats de l'analyse des données biochimiques sont reportés en dessous.

16.1 Activité des peroxydases et de la superoxyde dismutase dans *Conyza* après exposition au paraquat ou exposition à l'ozone

Nous avons un certain nombre d'activités peroxydasiques dans les feuilles de *Conyza* exposées au paraquat, comme à l'ozone. Sont ainsi enregistrées les activités suivantes :

1. *Peroxydases totales*;
2. *Gaïacol peroxydase*;
3. *Ascorbate peroxydase*;
4. *Supéroxyde dismutase*.

16.2 L'exposition au paraquat

L'exposition au paraquat détermine une croissance généralisée des différentes activités analysées, soit dans les espèces sensibles que dans les espèces résistantes. La réponse est assez rapide ; on peut observer une grande part de l'effet final déjà à **24 heures** entre 50% et 100%. Il n'y a pas des différences appréciables dans le comportement de l'espèce sensible et l'espèce résistante. Les données sont montrées dans les figures Fig. 16,17,18,19 et dans les tableaux Tab.12,13,14,15,16,17,18,19.

Valeurs d'activités de Supéroxyde dismutase et des peroxydases des feuilles de *Conyza bonariensis* traitées au paraquat 0.001%, durant **4h**.

Tab.12 : Supéroxyde dismutase

(AS : UI/ mg)

SOD résistant	0h	12h	24h	48h
	17	19	21.60	22

	16	18	20.90	21
	18	20	22.80	23
Contrôle	12	13	14	12
	13	14	12	14
	11	11	10	11

Tab.13: Supéroxyde dismutase

(AS : UI / mg)

SOD sensible	0h	12h	24h	48h
	12.60	13	18	20.80
	11.7	12	17	19.60
	13.50	14	19	21.50
Contrôle	11	13	14	15
	12	10	12	13
	14	12	13	11

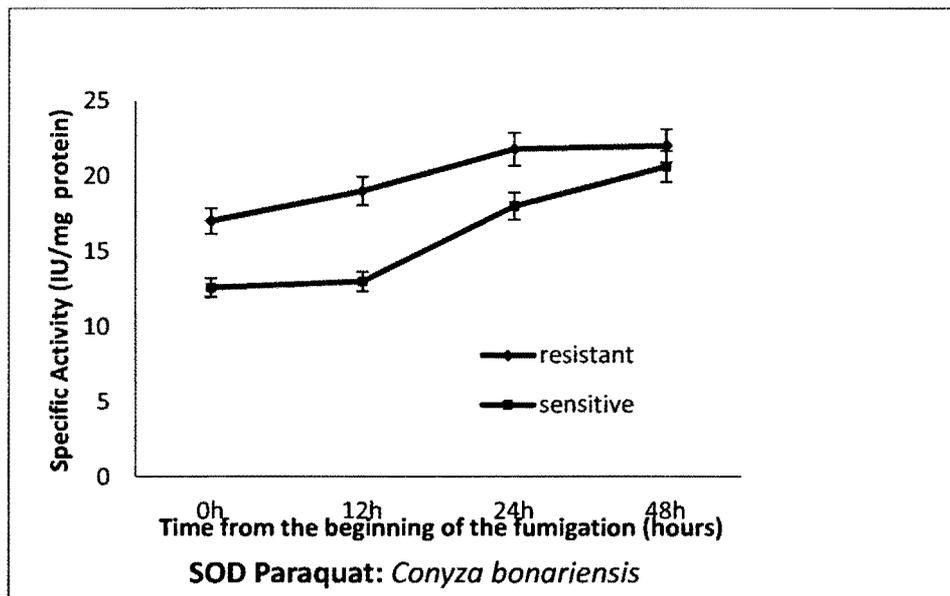


Fig. 15: Activité Supéroxyde dismutase en fonction du temps d'exposition au paraquat

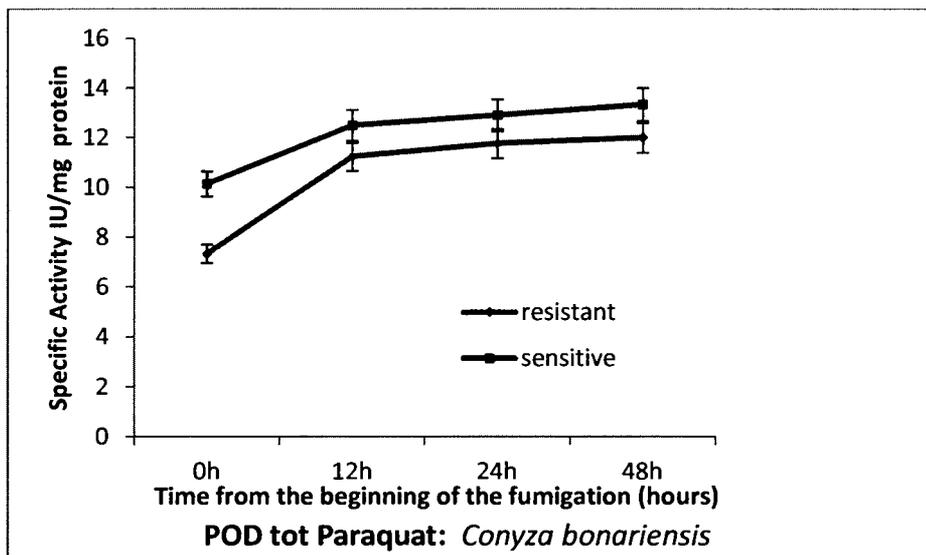
Tab.14: Peroxydases totales (AS: UI/ mg)

PODtot résistant	0h	12h	24h	48h
	7.35	11.26	11.74	12.02
	7.35	11.76	12.30	12.30
	6.80	10.68	11.25	11.65
Contrôle	8.48	7.87	8.80	8.48

	7.45	10	8.45	8.35
	8.00	8.00	8.50	8.43

Tab.15: Peroxydases totales (AS: UI/ mg)

PODtot sensible	0h	12h	24h	48h
	10.03	12.47	12.89	13.32
	10.49	12.98	13.30	13.81
	9.60	12.01	12.50	12.85
Contrôle	8.2	7.93	8.6	8.83
	8.54	7.45	7.89	8.45
	7.8	8.7	8.10	8.03

**Fig. 16: Activité des Peroxydase totales en fonction du temps d'exposition au paraquat****Tab.16: Ascorbate peroxydase (AS: UI/ mg)**

APX résistant	0h	12h	24h	48h
	0.025	0.022	0.029	0.035
	0.020	0.029	0.029	0.029
	0.022	0.025	0.025	0.035
Contrôle	0.023	0.017	0.023	0.017
	0.018	0.021	0.016	0.020
	0.020	0.019	0.019	0.021

Tab.17 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg)

APX sensible	0h	12h	24h	48h
	0.016	0.020	0.029	0.028

	0.018	0.020	0.027	0.036
	0.011	0.023	0.020	0.025
Contrôle	0.013	0.016	0.014	0.017
	0.011	0.013	0.011	0.016
	0.010	0.011	0.012	0.013

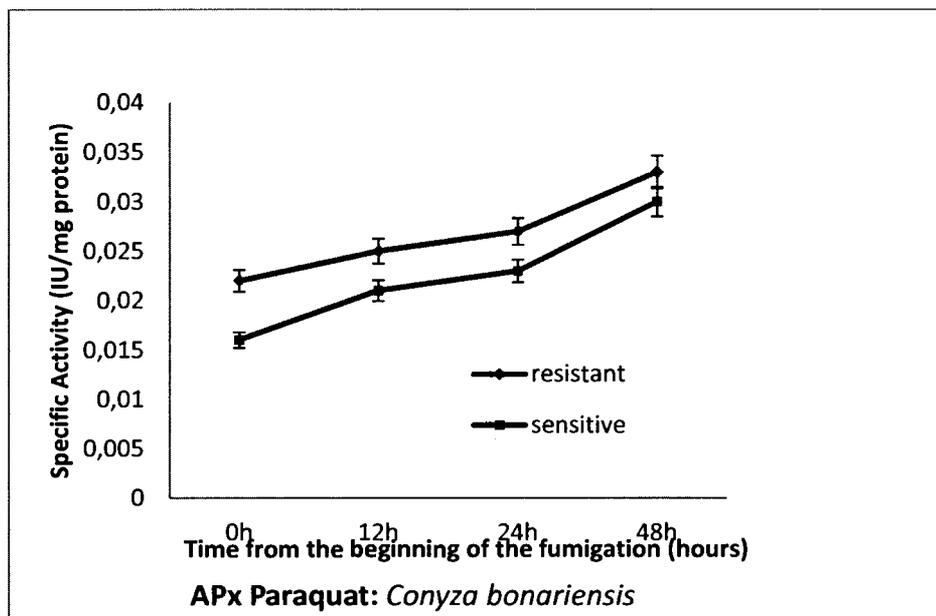


Fig. 17: Activité Ascorbate peroxydase en fonction du temps d'exposition au paraquat

Tab.18: Gaïacol peroxydase (AS : UI / mg)

GuPX résistant	0h	12h	24h	48h
	1.66	2.15	2.63	3.06
	2.00	2.50	3.00	3.56
	1.35	1.80	2.00	2.76
Contrôle	1.10	1.53	1.2	1.34
	1.00	1.24	1.15	1.08
	0.95	1.45	1.08	1.15

Tab.19: (AS: UI/ mg)

GuPX sensible	0h	12h	24h	48h
	2.45	2.00	2.08	3.82
	2.90	2.87	2.68	4.22
	2.00	2.29	2.00	3.52
Contrôle	0.97	1.35	1.43	1.38
	0.85	1.11	1.14	1.20
	0.78	1.24	1.55	1.45

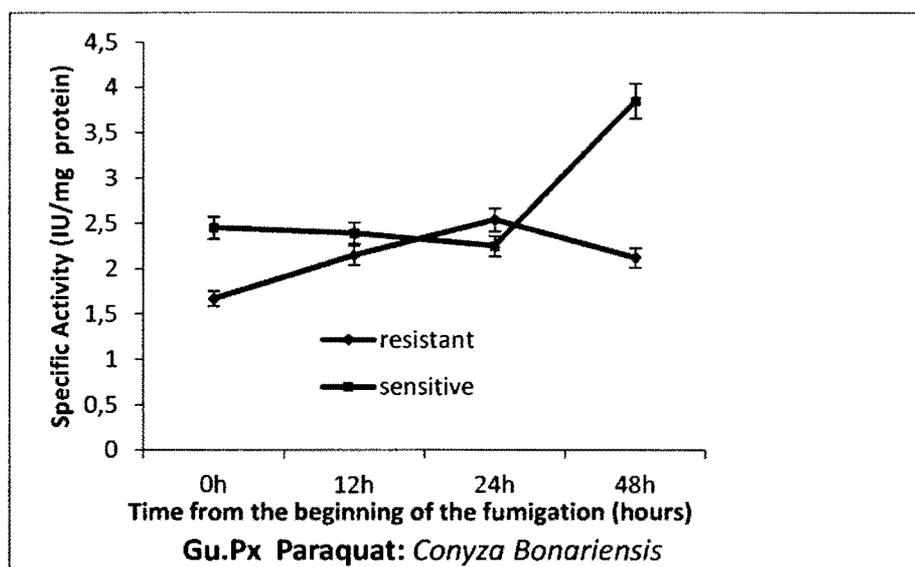


Fig. 18: Activité Gaïacol peroxydase en fonction du temps d'exposition au paraquat.

16.3 L'exposition à l'ozone

L'exposition à l'ozone de *Conyza* détermine une augmentation généralisée des activités enzymatiques considérées soit dans l'espèce sensible que dans l'espèce résistante. Le temps de réponse est légèrement plus long que dans le cas du paraquat (particulièrement plus long dans le cas de l'APX). L'augmentation maximale des activités enzymatiques se situe aux environs de 100%. On observe un certain comportement différentiel entre les espèces dans le cas de la SOD ; en effet la variété résistante développe une réponse significativement majeure (croissance > 100% dans la résistante ; croissance de 20% dans la sensible) dans des temps relativement brefs. La réponse à la POD est plus rapide dans la variété sensible que dans la variété résistante. Les données sont contenues dans la Fig.20 et les Tab. 22, 23.

Les valeurs de l'activité de la Supéroxyde dismutase et des Peroxidases des feuilles de *Conyza bonariensis* traitées à l'ozone avec 200 ppb, durant 5h.

Tab. 20: Supéroxyde dismutase (AS: UI/ mg)

SOD résistant	0h	12h	24h	48h
	9.86	18.9	19.27	22
	8.66	17.8	18.37	21
Contrôle	10.96	20.9	20.17	23
	10	13.7	12.35	10.35
	10.5	10.5	12.5	11.6
	11	11	12	11.3

Tab. 21 : Supéroxyde dismutase. (AS : UI / mg)

SOD sensible	0h	12h	24h	48h
	11.26	13.5	13.96	15.42
	10.36	12.4	12.86	14.32
	12.16	14.3	14.76	16.22
Contrôle	7.8	11.1	13.9	12.7
	8.9	12	12.3	12.3
	9	11	11.6	11.9

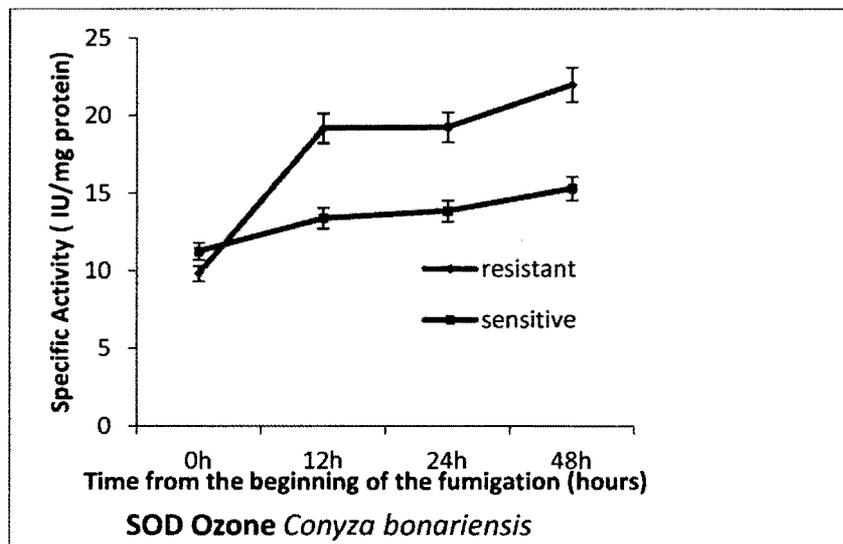


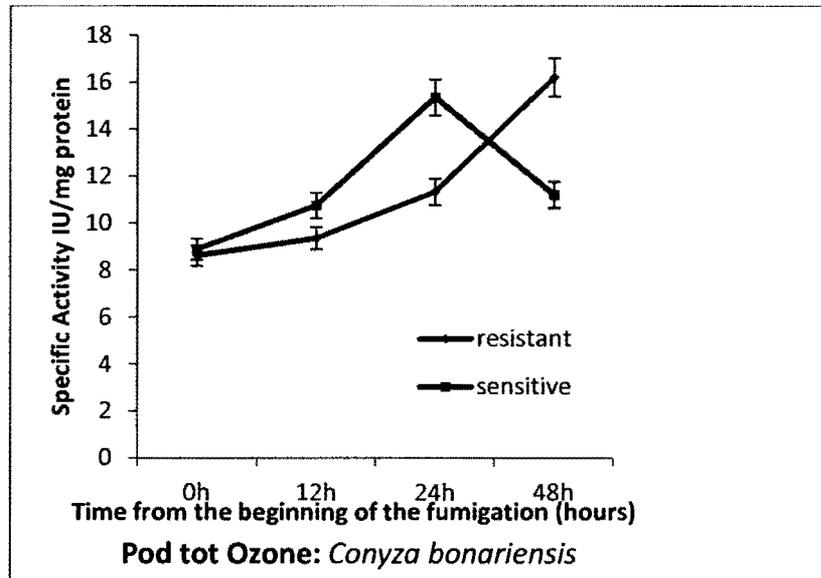
Fig. 19 : Activité de la Supéroxyde dismutase en fonction du temps d'exposition à l'ozone 200 ppb, 5h.

Tab. 22: Péroxydases totales. (AS: UI/ mg)

PODtot résistant	0h	12h	24h	48h
	8.62	9.37	11.37	16.42
	9.13	9.8	11.83	15.8
Contrôle	8.12	8.92	10.80	16.41
	8.32	9.64	10.23	13.6
	8.34	8.70	10	12.6
	8.02	8.24	9.4	11.8

Tab. 23 : Peroxydases totales. (AS : UI / mg)

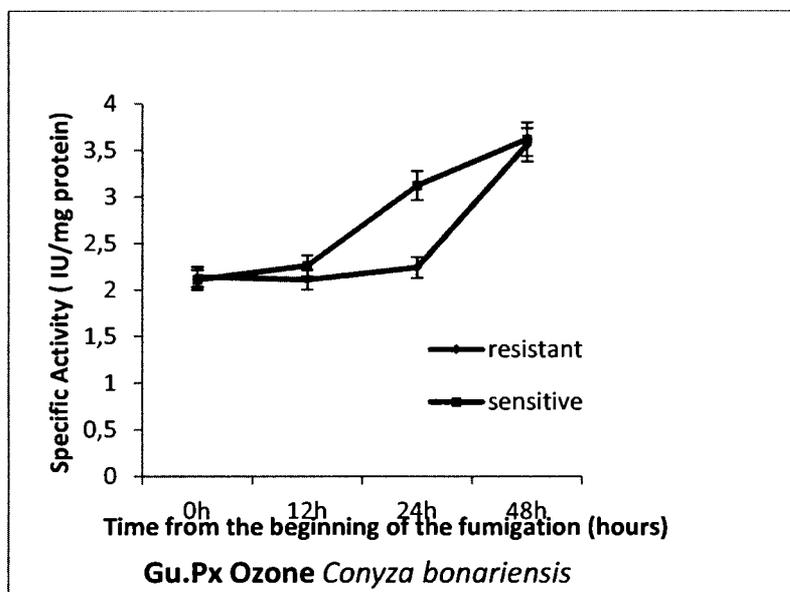
PODtot résistant	0h	12h	24h	48h
	8.83	10.72	15.80	11.35
	9.43	11.30	15.61	11.92
Contrôle	8.40	10.22	14.65	10.32
	8.11	9.21	9.44	10.27
	8.50	9.00	11.00	10.00
	8.00	9.75	10.50	11.00

**Fig. 20: Activité des Peroxydases totales en fonction du temps d'exposition à l'ozone, 200 ppb, 5h.****Tab. 24: Gaïacol peroxydase (AS: UI/ mg)**

GuPx résistant	0h	12h	24h	48h
	2.13	2.08	2.21	3.66
	2.40	1.85	2.55	3.95
Contrôle	1.90	2.40	1.95	3.25
	2.26	2.37	2.13	2.54
	2.50	2.22	2.40	2.00
	2.00	1.75	1.85	2.13

Tab. 25: Gaïacol peroxydase (AS : UI / mg)

GuPX sensible	0h	12h	24h	48h
	2.09	2.29	3.11	3.66
	2.45	2.50	3.45	3.95
Contrôle	0h	12h	24h	48h
	1.80	2.00	2.80	3.25
	2.15	2.20	2.52	2.45
	1.89	2.00	2.34	2.23
	1.80	1.94	2.22	2.12

**Fig. 21 : Activité Gaïacol peroxydase en fonction du temps d'exposition à l'ozone, 200 ppb, 5h.****Tab. 26 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg)**

APX résistant	0h	12h	24h	48h
	0.011	0.01	0.011	0.027
	0.013	0.01	0.013	0.029
	0.009	0.008	0.009	0.025
Contrôle	0h	12h	24h	48h
	0.007	0.009	0.003	0.006
	0.005	0.007	0.006	0.005
	0.008	0.005	0.005	0.004

Tab. 27 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg)

APX sensible	0h	12h	24h	48h
	0.006	0.006	0.013	0.025
	0.008	0.012	0.014	0.027
	0.004	0.008	0.010	0.023
Contrôle	0.008	0.004	0.013	0.007
	0.006	0.007	0.003	0.006
	0.005	0.006	0.004	0.005

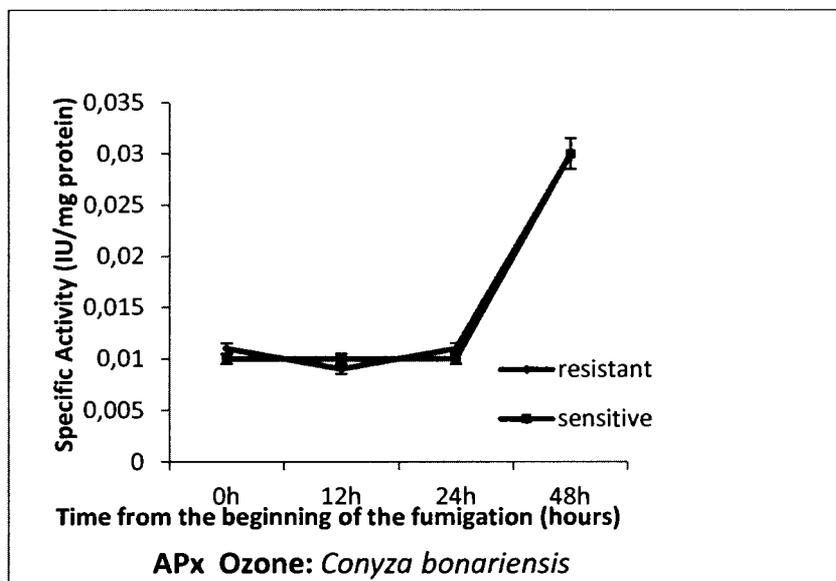


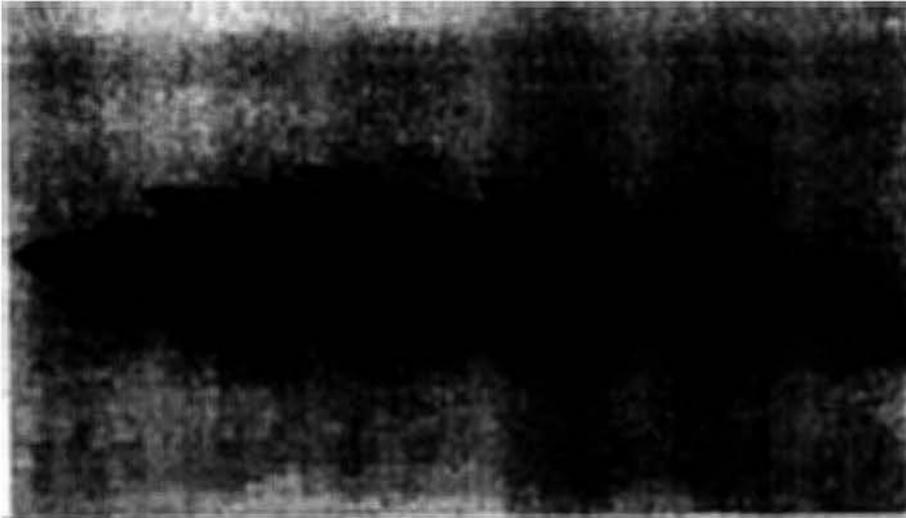
Fig. 22 : Activité de l'Ascorbate peroxydase en fonction du temps d'exposition à l'ozone, 200 ppb, 5h.

16.4 Analyse comparée des données de *Conyza bonariensis*

L'exposition des deux variétés de *Conyza* aux deux stress (ozone et paraquat) détermine généralement une augmentation sensible de l'activité enzymatique considérée. A partir du cas de la SOD, après exposition à l'ozone, l'on ne note pas de différence significative du comportement de la réponse enzymatique entre les espèces sensible et résistante.

Nous savons maintenant que la résistance au paraquat ne procure pas la résistance à l'ozone. Pour l'un et l'autre des deux cultivars, il y a activation enzymatique qui est un indice de réponse et de souffrance de la plante. Evidemment l'ozone et le paraquat n'utilisent pas les mêmes mécanismes de dommage moléculaire ; ou bien les mécanismes qui protègent du dommage dû au paraquat ne sont pas aussi efficaces eu égard à l'ozone.

Des dommages macroscopiques ont été remarqués sur l'espèce sensible, 24 heures après la pulvérisation du paraquat sur les feuilles.



Nécroses après 48 heures de traitement au paraquat : concentration utilisée 10 μ l dans 100 ml H_2O_2 + 250 μ l Tween 20



Nécroses avec jaunissement des feuilles de *Conyza bonariensis* après 48 heures d'exposition au paraquat.

Sur les photos 1,2 et 3, nous avons noté des nécroses sur l'espèce sensible, après 48 heures du traitement avec le paraquat. La concentration utilisée est de 10 μ l dans 100 ml de H_2O_2 + 250 μ l de Tween 20. La photo 3 représente les plantes résistantes et sensible, après 4 jours du traitement avec le paraquat dans les mêmes conditions.

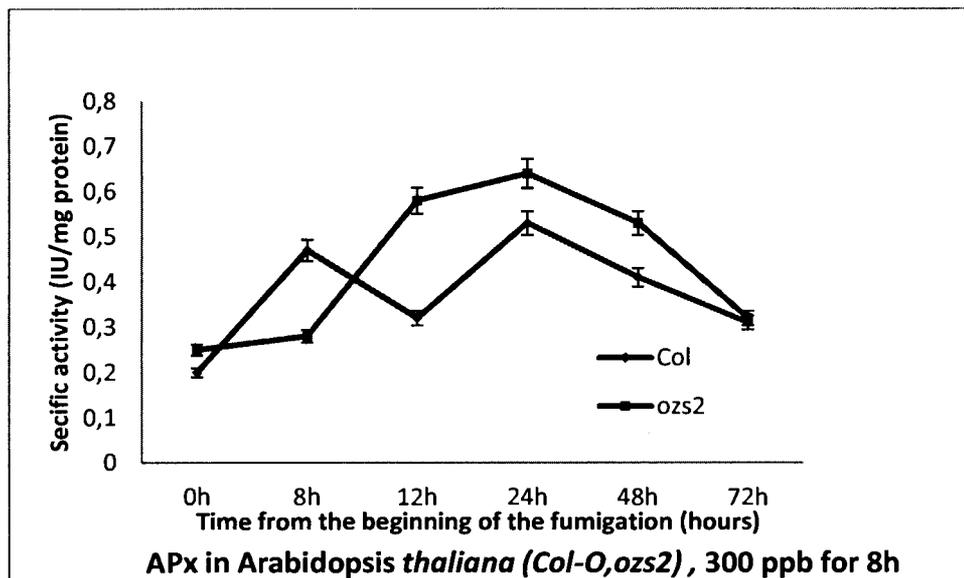
17. Recherche des bases moléculaires de la résistance : *Arabidopsis thaliana*

17.1 Activité Ascorbate peroxydase

L'activité de l'ascorbate peroxydase a été mesurée comme marqueur biochimique remarquable dans les deux souches d'*Arabidopsis thaliana*, Col-0, ozone résistant et ozone sensible *ozs2*, un des mutants réalisés après traitement avec le -EMS. De telles mesures ont été réalisées comme indiquées ci dessous.

La détermination d'activité enzymatique APX dans un mutant d'*Arabidopsis thaliana* et dans une souche sauvage, après exposition pour une période de 8 heures à 300 ppb.

Les mesures ont été effectuées sur trois échantillons aux temps : 0h, 12h, 24h, 48h, 72h. Tab.29, Tab.30, Tab.31, Tab.32, et Fig.23.



Activité de l'Ascorbate peroxydase (UI/mg) en fonction du temps d'exposition à l'ozone 300 ppb, 8h.

La détermination de l'activité enzymatique APX dans un mutant d'*Arabidopsis thaliana* et dans un type sauvage, après exposition pour une période de 8 heures, à des doses croissantes d'ozone (0-300 ppb) (détermination à 24h) Tab.33, Tab.34, Tab.35, Tab.36 et Fig.24.

De telles déterminations ont été effectuées suivant des protocoles rigoureux pour l'extraction de l'enzyme, la quantification de protéines totales, la détermination de l'activité enzymatique, l'analyse statistique des données expérimentale.

Des résultats obtenus, on note que l'exposition à l'ozone détermine, pour l'une et l'autre des espèces analysées une remarquable augmentation de l'activité APX. L'on peut conclure que

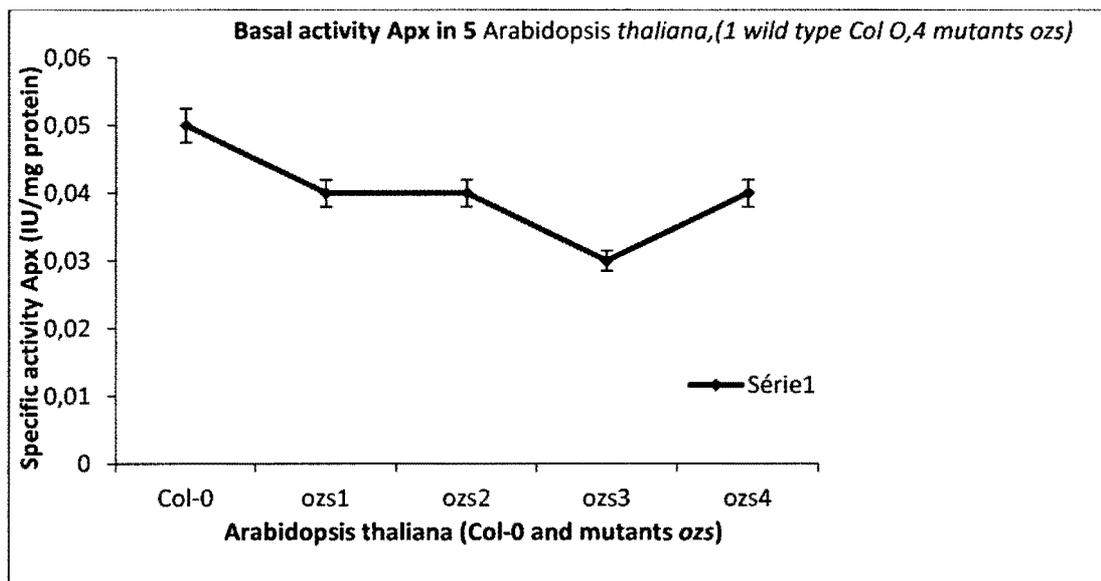
l'activité APX n'est pas corrélée à la variable sensibilité à l'ozone des deux espèces. Les différents résultats ont été consignés dans les tableaux suivants et les figures indiquées ci-dessous.

Activité basale ascorbate peroxydase (UI/mg) dans les feuilles des différentes souches d'*Arabidopsis thaliana*

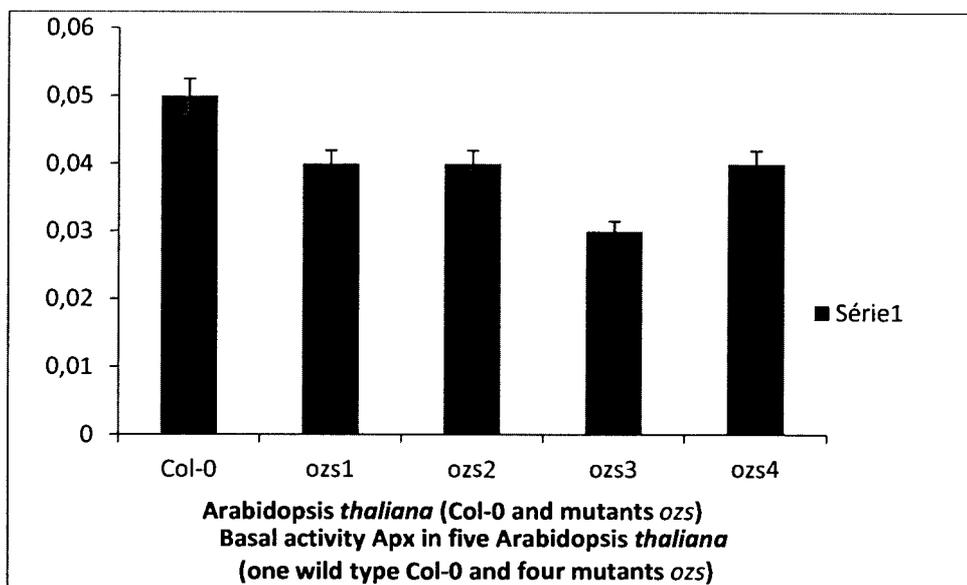
Tab.28 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg)

Col-0 (résistant) et *ozs1*, *ozs2*, *ozs3*, *ozs4* (sensibles).

Col-0	<i>ozs1</i>	<i>ozs2</i>	<i>ozs3</i>	<i>ozs4</i>
0.06	0.04	0.04	0.03	0.02
0.03	0.03	0.04	0.02	0.04
0.06	0.05	0.04	0.04	0.06



Activité basale de l'enzyme APX, mesurée dans Col-0 ; *ozs-1*, *ozs-2*, *ozs-3*, *ozs-4*



Tab.29 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg), 300 ppb, pour 8h.

Col-0	0h	8h	12h	24h	48h	72h
	0.22	0.46	0.45	0.39	0.20	0.36
	0.16	0.45	0.30	0.59	0.47	0.20
	0.22	0.51	0.20	0.60	0.56	0.38

Tab. 30 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg), 300 ppb, pour 8h

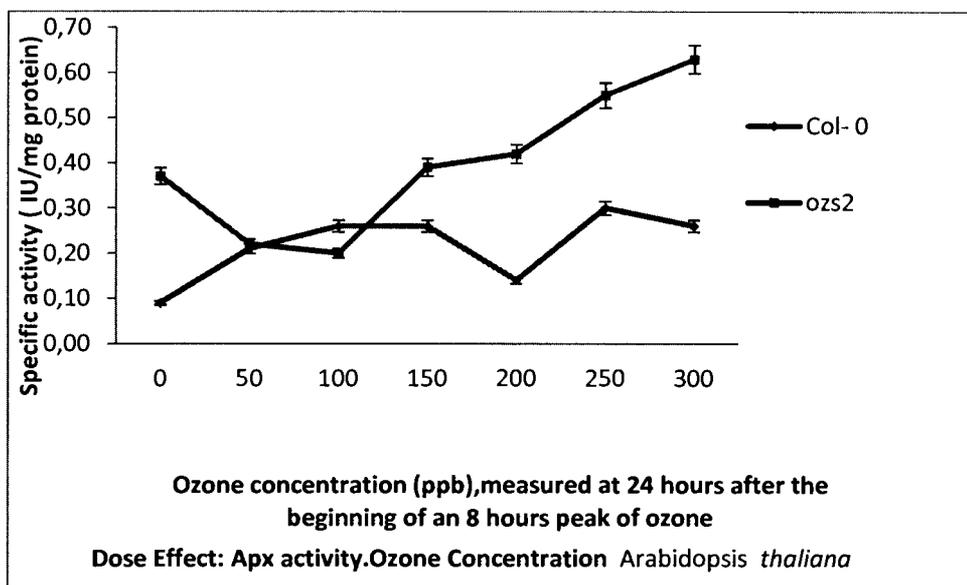
Contrôle	0h	8h	12h	24h	48h	72h
	0.21	0.26	0.38	0.50	0.30	0.18
	0.47	0.32	0.33	0.17	0.35	0.21
	0.47	0.47	0.35	0.17	0.47	0.30

Tab.31 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg), 300 ppb, pour 8h

ozs2	0h	8h	12h	24h	48h	72h
	0.18	0.06	0.63	0.73	0.47	0.34
	0.24	0.30	0.60	0.50	0.53	0.25
	0.33	0.47	0.52	0.69	0.60	0.36

Tab.32 : Ascorbate peroxydase (AS : UI / mg), 300 ppb, pour 8h

Contrôle	0h	8h	12h	24h	48h	72h
	0.28	0.05	0.21	0.38	0.22	0.25
	0.28	0.28	0.30	0.36	0.22	0.30
	0.20	0.17	0.28	0.45	0.45	0.40



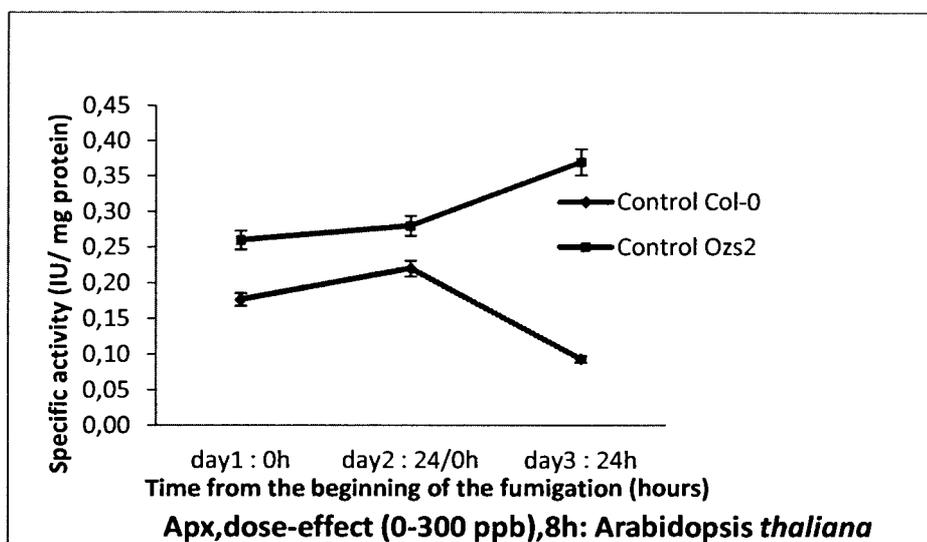
Ascorbate peroxydase (UI/mg) dose-réponse (0-300 ppb), 8h.

Tab.33 : Ascorbate peroxydase (UI/mg) dose-réponse (0-300 ppb), 8h.

Col-0	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb	250 ppb	300 ppb
	0.08	0.24	0.21	0.33	0.19	0.29	0.23
	0.07	0.15	0.25	0.22	0.16	0.33	0.31
	0.13	0.24	0.31	0.22	0.08	0.29	0.24

Table.34 : Ascorbate peroxydase (UI/mg), dose-réponse (0-300 ppb, 8h).

Contrôle ozs2		
Jour 1	Jour 2	Jour 3
0h	24h /0h	24h
0.26	0.33	0.31
0.22	0.27	0.59
0.29	0.25	0.21



La détermination d'activité enzymatique APX dans un mutant d'*Arabidopsis thaliana* et dans une souche sauvage, après exposition pour une période de **8 heures à 300 ppb**.

Les mesures ont été effectuées sur trois échantillons aux temps : 0h, 12h, 24h, 48h, 72h. **Tab.29, Tab.30, Tab.31, Tab.32, et Fig.23.**

La détermination de l'activité enzymatique APX dans un mutant d'*Arabidopsis thaliana* et dans un type sauvage, après exposition, pour une période de 8 heures, à des doses croissantes d'ozone (**0-300 ppb**) (détermination à 24h) **Tab.33, Tab.34, Tab.35, Tab.36 et Fig.24.**

Table. 37 : Table des concentrations de protéines totales (ugr/μl), après un traitement de 300 ppb pour 8 heures.

Echantillons	0h	8h	12h	24h	48h	72h
Col-0 300ppb	3,97	4,09	4,13	3,81	3,6	3,73
	4,33	4,82	5,19	5,03	4,54	4,62
	3,93	5,22	0,72	3,85	4,22	4,22
Col-0 control	3,94	4,23	4,09	3,81	4,22	3,51
	4,15	4,76	5,23	4,6	4,85	4,38
	3,38	4,86	4,72	3,8	3,93	4,37
ozs2 300ppb	3,63	0,89	3,86	4,06	3,85	3,32
	3,94	4,72	4,49	4,28	4	4,29
	4,17	4,41	4,77	3,45	4,31	4,23
ozs2 control	3,6	1,6	3,37	3,76	3,82	3,23
	4,6	5,13	5,21	6,33	4,71	4,65
	4,18	2,87	4,74	4,51	4,22	4,09

Pour les espèces analysées, on observe une croissance remarquable de l'activité APX. L'activité n'est pas corrélée à la sensibilité variable à l'ozone des espèces, mais pour la

réponse dose effet, *l'activité APX est corrélée à la sensibilité variable*. Des études de corrélation entre dommage macroscopique et concentration d'ozone dans les espèces sensibles : le dommage macroscopique s'est révélé pour la concentration d'ozone **supérieure à 150 ppb**.

DISCUSSION

18. Le *Phaseolus vulgaris*

Le stress oxydatif dans les plantes a été amplement étudié ces dernières années (Kangajärvi *et al.* 1994). La toxicité à l'ozone dérive principalement de son potentiel de réduction élevé (2.07 V), qui conduit à la formation "des espèces d'oxygène réduit", parmi lesquels hydroxydes d'oxygène, des radicaux supéroxydes et des radicaux hydroxyles. Ces espèces réagissent rapidement avec les biomolécules provoquant une perturbation sévère des processus métaboliques (Wolf *et al.* 1986 ; Mehlhorn *et al.* 1990). Dans les conditions normales, les plantes ont des systèmes anti oxydatifs suffisants pour éliminer ces espèces toxiques. Toutefois si la concentration des espèces toxiques devenait trop élevée, la capacité anti oxydative bien qu'augmentée pourrait être insuffisante pour protéger la plante contre le dommage oxydatif. Dans ces conditions apparaissent, les premiers signes de souffrance des plantes.

Les plantes sont dotées de plusieurs mécanismes diversifiés de défense pour se protéger de l'attaque contre l'ozone. Ces mécanismes sont : i) la synthèse de l'éthylène ; ii) la synthèse des polyamines ; iii) l'induction de la voie des phényles propanoïdes et des flavonoïdes ; iv) induction des gènes et des protéines de la réponse pathogène ; v) induction des enzymes du stress oxydatif. Ces mécanismes particuliers ont été passés en revue amplement par (Kangajärvi *et al.* 1994). Sur la base de l'efficacité des systèmes anti oxydatifs, il est possible de distinguer les souches sensibles à l'ozone et les souches résistantes.

Sans doute, les enzymes du stress oxydatif, principalement la supéroxyde dismutase, les peroxydases et les catalases ont un rôle crucial dans la défense contre le dommage dû à l'ozone. Ces dernières années il a été d'un grand intérêt à définir le rôle individuel de ces enzymes pour la protection contre le stress oxydatif. Même si en présence de données contradictoires dans la littérature (Kangajärvi *et al.* 1994 ; Kubo *et al.* 1995 ; Batini *et al.* 1995), il est certain que ces activités enzymatiques généralement augmentent en réponse à l'exposition à l'ozone ainsi, comme suite aux autres stress. En particulier, il a été démontré une certaine corrélation entre l'activité SOD et l'Ascorbate peroxydase, justifiée par le fait que ces deux enzymes à la fois appartiennent à la cascade de Halliwell Asada. Quelques preuves ont été faites pour produire des plantes transgéniques, avec une augmentation du niveau de la SOD, afin d'augmenter la résistance au stress oxydatif (Bowler *et al.* 1992).

Il a démontré que l'activité des enzymes du stress oxydatif soit strictement contrôlée par des métabolites à bas poids moléculaire; il pourrait se passer une activation des voies de la défense métabolique contre l'ozone, peut être prévoyant l'induction des enzymes anti oxydants. Ceci pourrait expliquer les divers effets métaboliques conséquemment à l'exposition à l'ozone, observés dans les différents cultivars.

Par conséquent pour clarifier quelques aspects encore contradictoires de la physiologie des plantes, nous avons suivi quelques activités enzymatiques dans des variétés de *Phaseolus vulgaris* ozone résistantes et ozone sensibles après exposition aigue à l'ozone. Notre objectif

consiste à comprendre les bases moléculaires de la résistance des plantes au stress oxydatif et de clarifier le rôle individuel des différentes enzymes anti oxydantes.

Nos investigations sont organisées de manière telle à suivre les activités d'un certain nombre d'enzymes de SOD et de PX dans les feuilles de haricot, particulièrement le Zn/Cu-SOD, l'ascorbate peroxydase, le gaïacol peroxydase et la syringaldazine peroxydase. Les premières enzymes correspondent aux enzymes du stress oxydatif, l'ultime la Syr.PX est une des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la lignine (Pandolfini *et al.* 1992). Notre recherche, nous a donné l'opportunité d'enregistrer simultanément les différentes activités métaboliques.

Il est communément accepté que le stress oxydatif dû à l'ozone, identiquement aux autres stress abiotiques au niveau des plantes, résulte dans l'induction d'un certain nombre d'activités enzymatiques, qui augmente la capacité anti oxydative totale de l'organisme ; en particulier les activités de la SOD, la PX et les Catalases ont été corrélées à l'exposition au stress oxydatif dû à l'ozone.

Cependant jusqu'à présent, les données des activités enzymatiques en réponse à l'attaque à l'ozone seraient manifestement contradictoires, montrant des différences interspécifiques et inter variétés. Pour notre opinion, cette large variabilité est principalement imputable à l'extrême complexité de la réponse biologique chez les plantes à l'ozone, qui résulte toujours dans l'induction de plusieurs voies métaboliques, strictement inter corrélées. Souvent la prédominance d'une de ces voies résulte dans l'activation réduite ou aussi de la répression des autre. Par exemple, l'élimination efficace des oxyradicaux toxiques à travers les mécanismes alternatifs pourrait empêcher l'activation des enzymes de la cascade de Halliwell Asada.

Pour pouvoir récolter des données nouvelles et éclairer ces aspects importants de la physiologie de la plante, nous avons déterminé un certain nombre d'activités enzymatiques dans les feuilles d'un cultivar ozone résistant et d'un cultivar d'ozone sensible de haricot en réponse au stress dû à l'ozone. En particulier, les activités de la SOD et des Peroxydases ont été déterminées après exposition des plantes de Haricot à une dose singulière, subléthale, d'ozone. Dans les conditions normales, les niveaux de bases des activités de SOD et de PX sont similaires dans les deux cultivars, même si sont un peu élevés dans la variété tolérante. Selon nous, cette légère différence ne pouvait pas expliquer la grande différence dans la sensibilité individuelle à l'ozone : d'autres mécanismes doivent exister pour expliquer la résistance à l'ozone du cultivar Groffi.

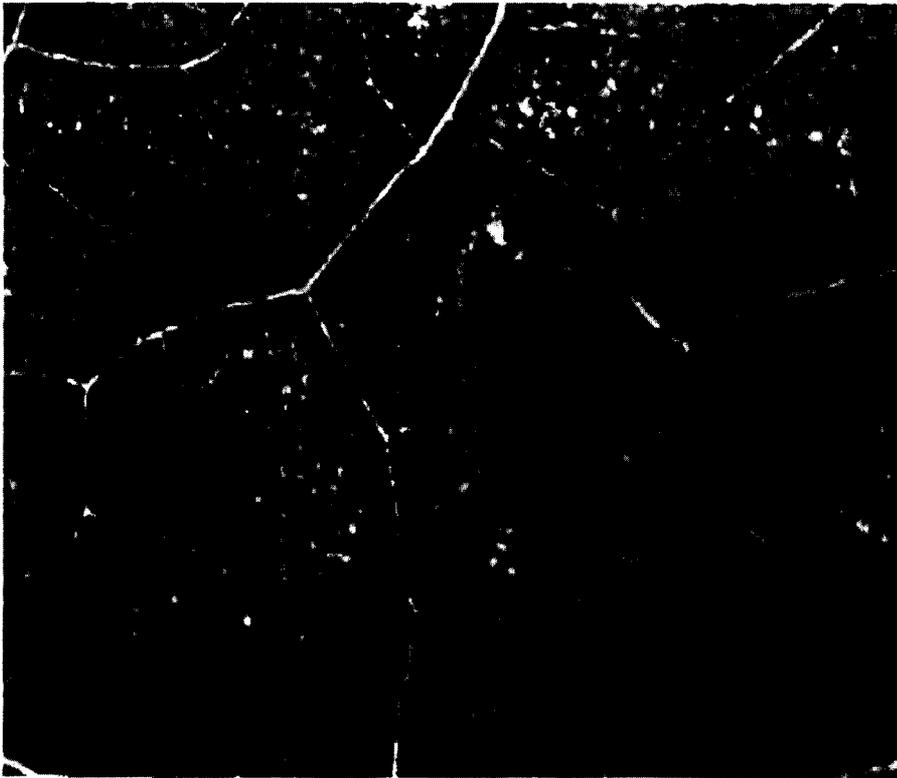
Le traitement des deux cultivars de Haricot à l'ozone pour **4 heures à 120 ppb**, provoque des effets paradoxaux. En effet, une augmentation dramatique, générale de toutes les activités enzymatiques est clairement observée dans le cultivar ozone tolérant. Cette croissance de l'activité de la SOD et de la PX requiert plus d'heures pour se réaliser, et atteint le maximum seulement après **48-96 heures**. Particulièrement, il y a une forte augmentation pour l'APX, la SOD et la Syr.PX pour lesquels, on note une croissance de l'activité **d'un facteur plus de 3**. Le temps de latence long requis pour observer l'augmentation des activités enzymatiques, suggère que ces processus soient de nature génique suivant la description classique de

l'induction enzymatique. Ainsi, la croissance de l'activité vraisemblablement correspondrait à l'augmentation du niveau d'expression de ces enzymes, plutôt que des phénomènes d'activation enzymatique. Il est d'un certain intérêt d'observer qu'une seule période d'exposition assez basse à l'ozone puisse donner des réponses importantes, même après 3-5 jours. Le contenu total des protéines mesuré avec la méthode de Bradford ne change pas significativement en réponse à l'exposition à l'ozone, suggérant que les variations observées dans les activités des enzymes sont limitées aux enzymes impliquées dans la protection contre le stress oxydatif et ne correspond pas à l'activation générale de la synthèse des protéines. Cependant, on pourrait noter qu'un certain nombre d'enzymes augmente leur activité simultanément de la même manière, peut être en réponse à un signal métabolique commun.

Le résultat plus intéressant de la notre recherche est représenté par la grande et inattendue différence de comportement entre la variété ozone résistante et la variété ozone sensible. A priori, nous aurions pu nous attendre de voir la situation inverse, i.e. une grande augmentation de l'activité enzymatique dans le cultivar ozone résistant, par rapport à celle du cultivar ozone sensible. En effet, un niveau plus élevé de la capacité antioxydante du cultivar résistant serait plus facilement, mis en relation avec la sensibilité mineure à l'ozone. Le fait que nous avons trouvé à travers nos données expérimentales le contraire, pourrait suggérer que dans le cultivar ozone résistant existent d'autres mécanismes, plus efficaces et plus rapides de défense contre l'attaque de l'ozone ; certainement des effets similaires ont été déjà rapportés dans la littérature. Cette interprétation conduit à l'idée de l'induction des enzymes antioxydants représentant un système de défense de "*première ligne*", contre l'ozone. Quand les mécanismes de "*première ligne*", sont insuffisants, l'induction des enzymes antioxydant soit ainsi activée.

Une autre interprétation serait possible sur la base d'une étude récente sur le rôle de l'éthylène (Langebartels, C. *et al.* 1991). La synthèse de l'éthylène s'est vue, augmentée considérablement, après l'exposition à l'ozone dans une variété Bel W3, tabac ozone sensible, cependant que son niveau serait resté bas dans la variété ozone résistante. Donc on remarquerait que l'éthylène serait induit par l'ozone, qui pourrait être médiateur de sa toxicité, provoquant l'apparition d'un certain nombre d'oxyradicaux de réactivité élevée, solubles dans l'eau, il se pourrait qu'une quantité élevée de l'éthylène induit, puisse représenter le déclencheur pour la réponse enzymatique dans le cultivar ozone sensible.

Des données expérimentales ultérieures sont maintenant nécessaires pour choisir parmi ces différentes hypothèses émises.



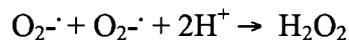
Feuille de Phaseolus pinto, prise au stéréoscope particulier



Phaseolus pinto: O₃ sensible, 120 ppb pour 4 heures, 24 heures après exposition à l'ozone.

19. *Conyza bonariensis*

Le paraquat concourt avec le photosystème I accepteur d'électrons. Les radicaux libres provenant du paraquat sont rapidement ré oxydés avec l'oxygène moléculaire, formant des anions superoxydes (T.C. Satancliffé et A. Pirie 1971). Le supéroxyde formé pourrait être un potentiel oxydant, donnant des radicaux hydroxyles, soit un réducteur formant l'oxygène singulier (H.D. Rabinovitch et Fridovich. 1983). La supéroxyde dismutase dismute le supéroxyde en oxygène et en péroxyde d'hydrogène suivant cette réaction :



La dismutation spontanée du supéroxyde se déroule avec une constante de vitesse de $10^5 M^{-1} sec^{-1}$ à pH physiologique, cependant que la supéroxyde dismutase catalyse cette réaction avec une vitesse 20 000 fois plus rapide (J.M. Mcord, J.D. Crapo, et I. Fridovich 1977). En présence de péroxyde d'hydrogène, la fixation photosynthétique du CO_2 se trouve inhibée (W.M Kaiser, 1976). La réduction du péroxyde d'hydrogène produirait des radicaux hydroxyles, qui conduisent à la péroxydation des lipides et du coup à la rupture des membranes (N. Harris et A. Dodge 1970). L'on ne sait toujours pas, jusqu'à ce moment les mécanismes moléculaires à travers lesquels les chloroplastes puissent détruire les radicaux hydroxyles provenant des péroxydes d'hydrogène. Les péroxydes d'hydrogène sont produits normalement en petite quantité durant la photosynthèse et vraisemblablement migreraient dans les chloroplastes mêmes, sans la participation des catalases péroxysomales qui seraient localisées en dehors. Dans un cycle d'ascorbate-glutathion, il a été démontré comment les péroxydes d'hydrogène seraient nettoyés, utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons et les enzymes l'ascorbate péroxydase et le glutathion réductase (C.H. Foyer et B. Halliwell 1976). Ces deux enzymes comme la supéroxyde dismutase seraient normalement à des niveaux suffisants pour permettre aux chloroplastes de détoxifier les supéroxydes produits durant la photosynthèse (A.D. Dodge 1982). La supéroxyde dismutase avec la constante de vitesse élevée ne devrait pas être un facteur limitant, quand le paraquat serait introduit, mais l'ascorbate péroxydase et le glutathion réductase seraient présents vraisemblablement à des niveaux insuffisants.

La résistance au paraquat a été observée dans *Conyza bonariensis* en Egypte (B.M., R. Harvey et D. B. Harper 1982), dans *Poa annua*, *Lolium perenne* (J. Gressel, H.U. Ammon, H. Hogelfors, J. Gasquez, Q. O. N. Kay et H. Kees, 1982) en Angleterre, dans *Erigeron philadelphicus* (Y. Watanabe, T. Honma, K. Ito, et M. Miyahara 1982) et dans *Conyza canadensis* au Japon (S. Matsunaka, communication personnelle) et dans *Hordeum glaucum* en Australie (R. B. Warner et W.B.C Mackie 1982). Souvent, les espèces d'*Erigeron* sont incluses dans ce même genre comme *Conyza*. Cet herbicide devrait rester en continu présent pour agir avec une haute pression de sélection requise pour obtenir des biotypes résistants. Tous ces biotypes se développent dans les aires où le paraquat est utilisé jusqu'à cinq fois l'année durant 10 ans, fait qui se substitue à la pression de sélection compensant le manque de persistance. Youngman et Dodge 1981 ont rapporté que la résistance dans le biotype de *Conyza*, n'était pas dûe à la différence de pénétration entre les deux souches. Il a été démontré qu'une augmentation de trois fois des niveaux de l'activité totale cellulaire

supéroxydasique et l'existence de deux nouveaux iso enzymes dans le biotype résistant. Ce haut niveau de supéroxyde dismutase assez ne peut être retrouvé par (Vaughn et Fuerst 1985), avec un matériel similaire. Mais, des niveaux élevés de la supéroxyde dismutase ont été retrouvés dans le *Lolium* résistant (B.M.R Harvey et D.B Harper 1982), et dans les plastes de *Spirodela*, dus à l'induction chimique de tolérance (E. Lewinsohn et J. Gressel, 1984).

Les mécanismes d'action du paraquat requièrent la réduction du paraquat di-cation à travers le médiateur PSI. Ainsi, se déroule la formation du radical mono-cationique. Le radical à son tour réduit l'O en O_2^- le radical anion supéroxyde, provenant de la régénération du di-cation du paraquat. En effet, le H_2O_2 et le radical hydroxyle OH pourraient provenir de diverses réactions (A.D. Dodge 1982, A.D. Dodge 1983). Les radicaux hydroxyles ont été impliqués dans la peroxydation des acides gras. Apparemment, ce serait une des causes de la perte de l'intégrité de la membrane observée (A.D. Dodge 1983, N. Harrison, (A.D. Dodge 1972, J.M. Huston 1979). Le supéroxyde et le H_2O_2 pourraient ne pas causer de fait la perte de l'intégrité de la membrane induite par le paraquat (J.M. Huston 1979). En plus de la formation de la forme réactive de l' O_2 , la présence du paraquat causerait la dispersion des électrons qui normalement auraient réduit le NADP, et auraient maintenu le statut réduit de l' α -tocophérol, le glutathion et l'ascorbate. L'action de la supéroxyde dismutase, de la catalase, de la peroxydase devraient rester inchangées par la dispersion des électrons.

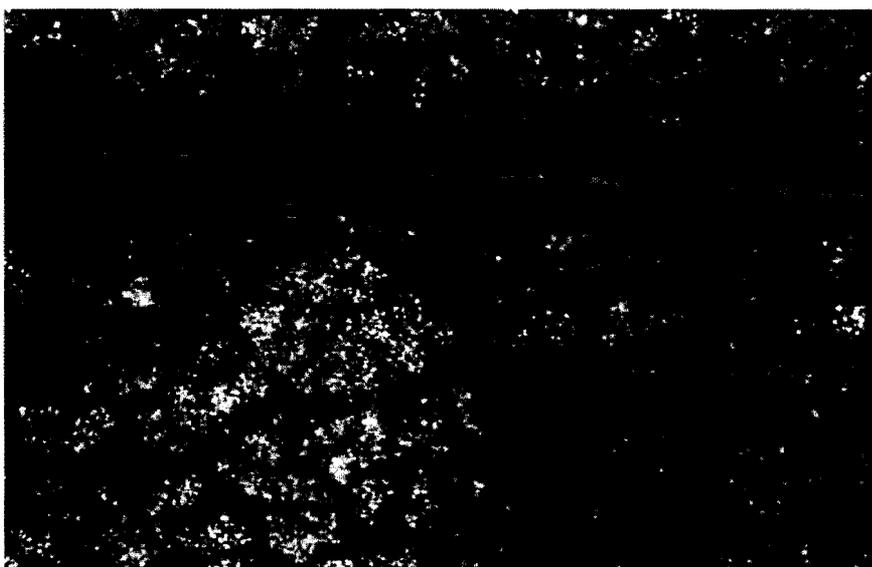
Beaucoup d'hypothèses expliqueraient les mécanismes de la résistance au paraquat de *Conyza bonariensis*. Pourraient être :

- La détoxification du radical anion supéroxyde ou d'une autre forme réactive d' O_2 , produite à la présence du paraquat ;
- L'altération du potentiel redox de l'accepteur électronique primaire du PSI ou ; du changement de compartiment du paraquat, résultant de la localisation réduite du site actif de l'herbicide ;
- La délocalisation métabolique du paraquat paraît improbable au moment où on n'aurait rien su sur un quelconque produit provenant du paraquat dans les plantes supérieures (L. A. Summers 1980).

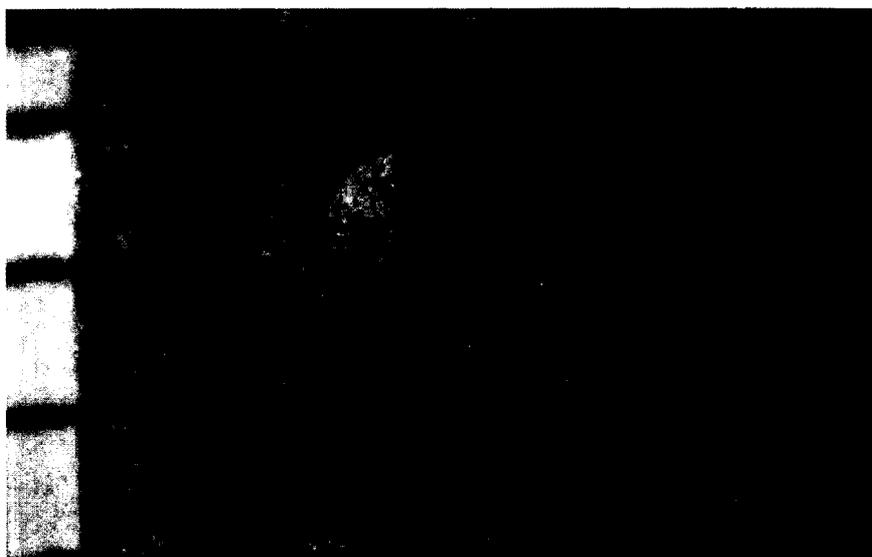
En conséquence, la seule activité superoxydasique ne nous permettrait pas d'expliquer la tolérance au stress oxydatif, il serait mieux de faire des études sur toutes les enzymes impliquées dans la supposée réaction de détoxification.

Nous avons vu dans ce travail que la résistance au paraquat ne procure pas la résistance à l'ozone. Pour l'un et l'autre des cultivars et suite à l'exposition à l'ozone, il y a activation enzymatique qui est indice de réponse et puis de souffrance de la plante.

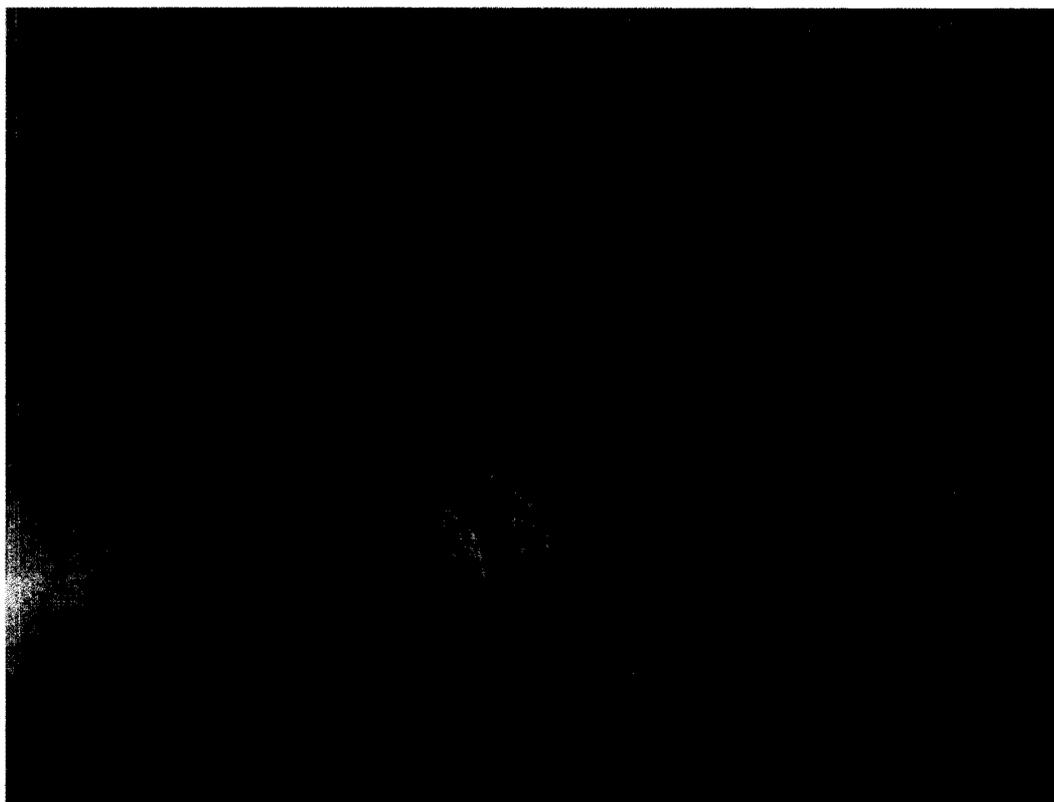
Conyza bonariensis



Nécrose à 24 heures, après exposition à l'ozone :200 ppb pour 5 heures

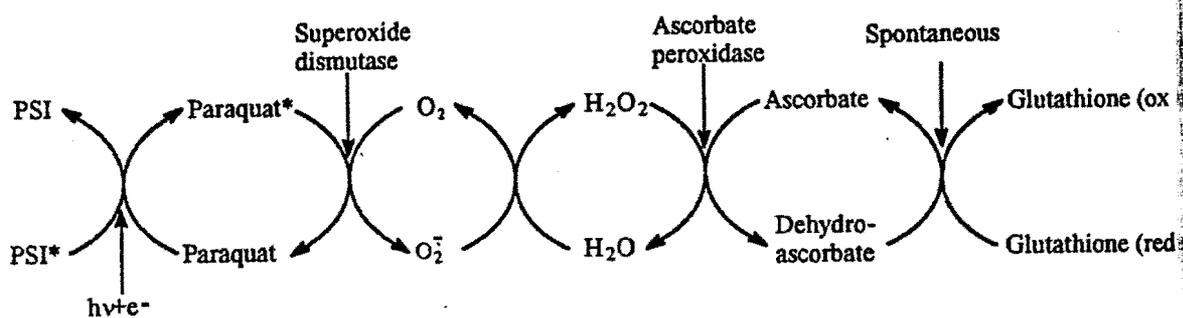


La distance d'un (1) point à un (1) autre est de un (1) millimètre



Conyza bonariensis : résistant

Conyza bonariensis : sensible



Conza bonariensis : resistant and sensitive plants. **4 days** after paraquat exposition.
 10 µl of paraquat in 100 ml H₂O + 250 µl Tween 20.

20. *Arabidopsis thaliana*

Pour les deux espèces analysées, l'on note une augmentation de l'activité APX. L'activité APX n'est pas corrélée à la sensibilité variable à l'ozone des deux espèces. Des études de corrélation entre dommage macroscopique et concentration d'ozone dans les espèces sensibles ont été faites. Le dommage macroscopique se révèle pour les concentrations d'ozone supérieures à **150 ppb**.

D'autres expériences devraient être réalisées (faire 5 répétitions pour chaque individu au lieu de 3), pour pouvoir avoir plus de fiabilité sur les résultats obtenus. Nous avons remarqué qu'il y a la grande variabilité des données statistiques. Mais nous dans d'autres études sur *Arabidopsis thaliana* (Kubo *et al.* 1995), ont été rapportées des données avec lesquelles l'activité de APX a été augmentée avant l'apparition des symptômes dans la souche *ozs2* sensible. En effet cette augmentation de l'activité ascorbate peroxydasique pourrait être interprétée comme la conséquence de l'induction des gènes de l'APX, qui apparait 24 heures après l'exposition à l'ozone. En effet, la mutation provoquée avec l'EMS paraît ne pas porter d'effets sur les gènes d'APX, parce qu'ils ont été induits dans les deux souches soit résistante, que sensible.

Pour la souche résistante Col-0, des études microscopiques doivent être réalisées sur les feuilles exposées à l'ozone. Des résultats assez faibles ont été rapportés au niveau basal de l'activité d'APX sur les souches Col-0, résistantes et les différentes variétés de souches ozone sensibles *ozs1*, *ozs2*, *ozs3*, *ozs4*. Une analyse qualitative des résultats révèle que leur activité d'APX est **5 fois presque inférieure à celles de leurs contrôles**. Il était attendu que de tels résultats seraient inférieurs ou au moins égaux à ceux des contrôles respectifs. Par conséquent, cette explication justifierait de faire d'autres échantillonnages pour confirmer ces résultats.

Nous avons ainsi enregistré des concentrations protéiques qui ne varient pas aussi bien dans les feuilles des contrôles que celles des traitées **Tab. 37**. Ainsi, la synthèse totale des protéines n'a pas varié.

Pour suivre avec plus de précaution cette question de l'action détoxificatrice d'autres enzymes impliquées dans ces processus doivent être répertoriées, telles que la SOD et le Glutathion S transférase.

Définition des paramètres répertoriés

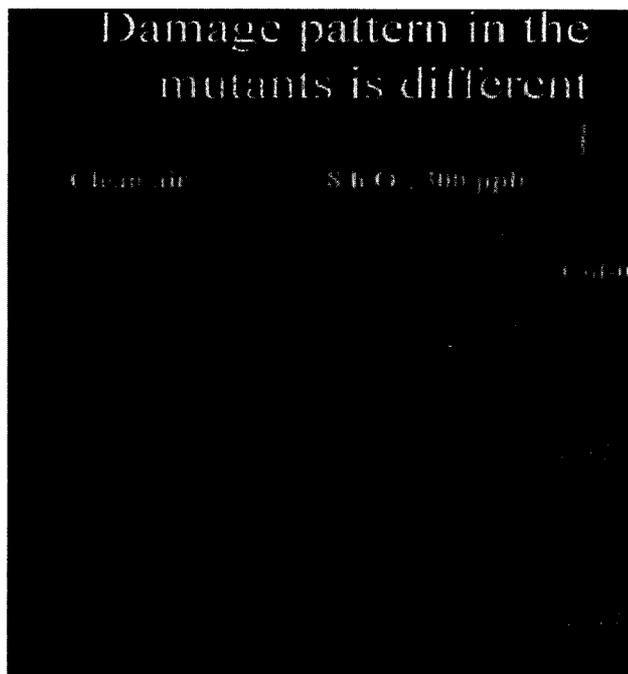
Comme signalé dans l'introduction, les effets de l'ozone sont multiples et variés, en fonction de l'intensité et de la durée de l'exposition. Dans le cas de concentration de hauts et petits pics de concentrations d'O₃, le dommage se manifeste à travers des lésions visibles des nécroses cellulaires. La disparition des nécroses localisées, le schéma des marqueurs biochimiques et histologiques et l'expression des gènes de la défense, associés à leur formation, ressemblent à la réponse hypersensible (HR) aux pathogènes (Kangajärvi, J. *et al.* 1994, Sandermann, H. 1996). La HR est considérée comme une forme dans les plantes de mort programmée des cellules, dans laquelle les ROI sont impliquées dans l'initiation et dans la propagation (Dangl, J.L., Dietrich, R. a et Richberg 1996). En aval, tous ces problèmes ont

soulevé des questions sur les mécanismes communs et possibles induits par les pathogènes et l'ozone au cours de l'explosion oxydative et la nature de la mort cellulaire due à l'ozone ((Kangajärvi, J. *et al.* 1994 ; Schraudner, M. *et al.* 1996 ; Sandermann, H. 1994 ; Sharma, Y. et Davis, 1994). Pour clarifier ces demandes, des semences d'*Arabidopsis thaliana* écotype columbia (Col-0) ozone tolérantes traitées avec un agent mutagène EMS, ont été criblées jusqu'à obtenir à nouveau une sensibilité à l'ozone, comme c'est déterminé à l'exposition à l'O₃ (**300 ppb pour 3 jours, 8 heures/jour**), ensuite contrôler à travers une inspection visuelle les lésions des cellules mortes. Quatre mutants, ozone-sensible 1-4 (*ozs 1-4*), chacun a son phénotype caractéristique propre et son modèle de formation du dommage dû à l'ozone, ont été sélectionnés pour l'étude. Dans les conditions standards d'expérience, on a utilisé des plantes croissant à basse densité (5 plantes / 9x9 cm par contenant), avec une photopériode (250-300 μmôle/ m²s d'irradiation), à 21° C/18°C jour/nuit de température sans ozone durant 21 jours. Les plantes traitées à l'ozone sont exposées durant 8 heures à 300 ppb. Des plantes de 10 jours et 14 jours sont exposées à l'O₃ montrent que la sensibilité ne dépend pas de l'âge, même si nous l'avions testée.

Sans O₃, tous les mutants paraissent normales, sains excepté ceux de *ozs4* qui paraissent pâles et petits de taille. Dans une certaine mesure ceux de *ozs2* des efflorescences précoces, avec une sénescence prématurée, cependant que les mutants de *ozs3* ont des efflorescences tardives avec un phénotype "toujours vert". Des expériences de dose-réponse avec *ozs2* ont indiqué que moyenne de formation du dommage ne relevait que d'un traitement d'autour de **150 ppb**. La régulation et la séquence de formation du dommage advenait tout aussi identiquement, soit à 200 ppb ou 300 ppb pour tous les mutants, commençant avec des lésions obscures imprégnées d'eau après 12 heures et plus, qui brunissaient pour chuter après 24 heures. L'élargissement se propage ainsi entre 24 ou 48 heures, progressant vers une lésion définie de tissus morts et asséchés à 48 heures. De toutes les façons, le modèle des tissus endommagés, varie visiblement entre les mutants : *ozs1* et *ozs4*, qui ont des lésions distribuées aléatoirement, ayant lieu sur des tissus intra vasculaires.



Feuilles de Col-0 et de *ozs2,ozs3*.



Schémas des dommages sur les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0 et *ozs2,ozs3*), après exposition à l'ozone 300 ppb, 8h et sans ozone.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'analyse poussée des paramètres biochimiques que nous avons enregistrés pourrait permettre d'établir au commencement :

- i) L'entièreté du stress et la souffrance intrinsèque de la plante ;
- ii) La capacité de réponse ;
- iii) La discrimination entre individus sensibles et résistants ;
- iv) L'identification des systèmes biochimiques fondamentaux pour la réponse à l'ozone.

Nous avons voulu par conséquent identifier et sélectionner des bio marqueurs fiables, qui seraient sensibles au stress, pour lesquels les variations aillent dans un sens cohérent. Nous nous proposons d'étendre ce travail à d'autres enzymes et/ou à des métabolites et/ou à des gènes.

La perspective est de sélectionner un nombre limité de paramètres à haute définition dans des différents types de stress qui puissent être utilisés en application pour le biomonitoring.

21. Le bio monitoring

21.1 Les plantes et la pollution de l'air en ville

La végétation terrestre est globalement exposée, soit toujours de manière irrégulière et discontinue, à la pollution atmosphérique qui actuellement représente pour cela un des principaux facteurs de stress. Les oxydes de soufre et d'azote et les oxydants photochimiques sont des polluants phytotoxiques de l'air (**PAP**) plus communs et représentatifs de la pollution générale. Les acides fluorhydriques, l'acide chlorhydrique et les autres composants d'origine industrielle peuvent ainsi endommager très gravement les plantes, mais de manière plus ou moins épisodique, de façon limitative aux aires autour des sources ponctiformes. Des informations sur les effets des plantes sur les singuliers PAP (Polluants Atmosphériques Phytotoxiques) indiqués, ont été organiquement récoltées en Italie par Lorenzini (1983).

21.2 Les feuilles, siège préférentiel de l'absorption des PAP

Pour le rapport élevé superficie/volume et pour être siège électif des échanges gazeux, les feuilles sont les organes des plantes plus exposées et vulnérables aux polluants gazeux. Ceux ci pénètrent à travers les stomates en se dissolvant dans les voiles liquides intercellulaires qui pénètrent les parois des cellules du mésophylle. L'augmentation de leur concentration dans la phase liquide intercellulaire ne facilite point la diffusion dans les cellules à travers les parois et le plasmalemme, cependant que le courant transpiratoire ne régule pas leur transport et dans certains cas leur accumulation en partie diverse de la feuille.

Il va de soit de fait que, les feuilles sont les organes des plantes qui subissent de manière patente les effets de la toxicité de l'air, manifestant les dommages visibles, évalués en termes de superficie foliaire nécrotique ou affectée par l'altération de couleur et de forme. Il est toutefois important de considérer que les concentrations non létales de polluants, incapables

de causer des symptômes remarquables, puissent déterminer des altérations physiologiques qui se traduisent en dommages improprement dits asymptomatiques, mais associés en réalité à la réduction de la croissance, physiquement évaluable, et/ou de sénescence anticipée.

21.3 Spécificité des symptômes

Dans des conditions de gaz contrôlés, les différents polluants phytotoxiques provoquent sur les plantes des symptômes relativement spécifiques et distinctifs. Malheureusement, la présence dans l'air des mélanges de composants toxiques souvent indéfinis, l'inconstance et la variabilité dans le temps de leur concentration, la variabilité des effets qu'un singulier polluant puisse exercer sur les diverses espèces et dans des conditions environnementales multiples, puis que l'interférence des autres stress biotiques et abiotiques, finissent par produire en nature les cadres symptomalogiques plus confus de ceux soutenables en laboratoire qui ne réduisent leur valeur diagnostique. Cependant l'analyse du type de symptôme et de son incidence sur les espèces de plante présentes dans une aire déterminée, est un moyen indispensable, à rapprocher l'analyse chimique de l'air, pour la reconnaissance en première approximation des PAP (Polluants Atmosphériques Phytotoxiques) (Matta et Pennazio, 1984).

21.4 Les plantes espions

Dans les environnements naturels, les plantes jouent une grande importance, pour leur sensibilité très élevée à des polluants spécifiques, pour la mise en évidence et le caractère typique de leurs symptômes, pour la diffusion capillaire dans le territoire et leur persistance sur un long arc de temps, c'est ainsi que ces plantes sont prêtes à être utilisées, comme un instrument de diagnostic de l'état de pollution de l'air.

Particulièrement adaptés à une telle fin, des résultats sur les lichens non seulement pour leur sensibilité intrinsèque aux polluants soit plus élevée de celle des autres organismes, si ce n'est plutôt pour la forte capacité d'absorber des composants xénobiotiques, qui provient de leur absence d'épiderme et de se maintenir actifs même pendant l'hivers à basse température. La détermination de la sensibilité aux polluants à diverses espèces lichéniques, a rendu possible la construction de cartes de pollution au SO₂ sur la base du nombre et de la fréquence des espèces présentes, en comparaison des localités polluées par rapport à leurs témoins.

La fonction de monitoring des lichens est particulièrement utile dans les environnements dans lesquels ils sont normalement présents, mais leur emploi aussi dans les aires urbaines et industrielles à travers des implants de cortex colonisés, et a été longtemps expérimentée (Anderson et Treshow, 1984) et récemment testée à Turin (Piervittori *et al.* 1993). Malheureusement l'absence presque totale des lichens dans les grandes villes est déjà de par soi un signal que les limites de pollution compatibles avec leur survivance est ici largement dépassée. Le monitoring des polluants phytotoxiques peut résulter plus de fait dans les environnements urbains et donner en général de plus précises indications, si c'est effectué sur

des plantes cultivées en vase ou dans des contenants appropriés. Les plantes de tabac "BEL W3", apprêtées dans des kit d'utilisation pratique (Lorenzini, 1993) permettent le monitoring de l'ozone, polluant qui est hautement et spécifiquement sensible.

21.5 Les plantes dans l'atmosphère de la ville

Dans l'environnement urbain, les arbres se trouvent constamment exposés à différents polluants phytotoxiques, parmi lesquels dominant le SO₂, les oxydes d'azote, mais rarement manifestent des symptômes spécifiques de souffrance aigüe. L'absence de dommages aigus rend moins dramatique la situation phytosaniatire et limite la possibilité d'utiliser les plantes les plus communes et les plus diffuses dans les avenues bordées d'arbres et des parcs des cités, comme bio indicateurs de l'environnement atmosphérique, ne consentant pas d'exclure de vérifier l'état de souffrance général.

L'analyse des concentrations des principaux polluants gazeux dans la ville de Turin, confirme que durant la saison végétative, on n'atteint pas les concentrations de SO₂, en mesure de causer des dommages visibles sur les feuilles. D'autre part les mêmes bien plus élevées moyennes des concentrations maximales relevées durant la période hivernale de taux majeur de SO₂, pouvant dépasser les limites prévues par la loi, pour des motifs d'hygiène, sont encore de plusieurs fois inférieures à celles qui seraient nécessaires à déterminer l'apparition des manifestations visibles pathologiques, si les plantes étaient en activité végétative.

A des concentrations sublétales le SO₂ subit dans les tissus un processus oxydatif de détoxification et est accumulé sous forme de sulfate saisonnalement expulsés avec la chute des feuilles. Ainsi les niveaux des oxydes d'azote dans l'air, souvent supérieurs à la limite fixée par la loi dans la période d'octobre-février, n'atteignent pas les concentrations toxiques pour les plantes durant la période végétative. Et il est ainsi probable que ces composés développent une fonction fertilisante avec des apports d'azote non négligeables en situation pédologique critique.

Les relevés à Turin, au niveau de la route, ne signalant pas la présence d'ozone durant toute la période hivernale, mais font enregistrer dans la concentration de ces PAP des moyennes des maximum journaliers un peu élevés, jusqu'à 0.067 ppm, durant la période végétative. Ces valeurs sont de par soi en mesure de causer des symptômes dans le tabac "BEL W3" qui avertit sur les concentrations de 0.04-0.05 ppm d'exposition supérieure à 4 heures (Lorenzini 1993). On doit en outre tenir compte que, selon comme indiqué de par les résultats des différentes expérimentations de vaporisation artificielle sur les espèces les plus disparates, l'ozone agit synergiquement avec le SO₂ (Omrod, 1982), chose dévolue à d'autres PAP, en particulier au bioxyde d'azote. Pour sans manifestation de symptôme de phytotoxicité aigüe, il est probable que les plantes des avenues bordées d'arbres et des parcs urbains, comme démontrés expérimentalement, comparant le développement de différentes espèces agraires et forestières en atmosphère dépourvu et sans PAP (Schenome *et al.* 1994), subissent par l'effet de la pollution atmosphérique, le ralentissement de la croissance et l'accélération de la sénescence.

Dans un tel cas, le stress chimique s'ajouterait en ville aux stress déterminés par les conditions de croissance durissime, défavorable à un développement végétatif équilibré, des traumatismes accidentels et des blessures provenant des nécessaires émondages des arbres.

La réapparition année après année sans interruption des épidémies de champignon et des insectes parasites est de plus un motif particulièrement grave de préoccupation. Par exemple, le platane, peut être l'arbre urbain plus représentatif, est frappé d'une grave maladie fongique (*Apiognomonina platani*) qui, au printemps, tue les pousses, les jeunes feuilles et les branches (Aselmi *et al.* 1994) et d'un insecte phytophage (*Corythucha ciliata*) qui complète l'opération donnant lieu dès le début de l'été à des infestations massives qui intéresseront à la fin de la saison la totalité de la superficie foliaire (Arzone, 1975). La présence des PAP, soit aussi en doses sublétales, ne peut qu'aggraver les situations phytosanitaires déjà de par soi les compromettre et les rendre précaires.

21.6 Les plantes dans l'environnement urbain comme bio indicatrices de la pollution

Pour le modeste nombre d'espèces et pour la tolérance élevée que ces plantes semblent présenter, le vert urbain se prête mal à fournir des indicateurs symptomatiques de la pollution atmosphérique. Pour le monitoring des polluants phytotoxiques atmosphériques PAP, on pourrait se servir des altérations physiologiques associées aux dommages asymptomatiques. Il a été individualisé diverses réponses métaboliques précoces (Jaeger, 1982), des actes à signaler sur les états de souffrance à son début dans les plantes exposées à des concentrations sublétales des PAP, mais malheureusement de non facile emploi diagnostic.

Une méthode de monitoring basée sur la mesure de l'augmentation de la fluorescence provoquée par une réduction du flux électronique due à une utilisation mineure de l'énergie lumineuse disponible durant la phase de la photosynthèse (Cecchi *et al.*, 1994), a été appliquée pour évaluer le degré de dépérissement des forêts, ainsi que par voie aérienne, mesurant le temps réel des spectres de fluorescence. L'augmentation des polyamines, suite au stress a été démontrée être un phénomène suffisamment généralisable et contrôlable dans toutes les plantes. Les polyamines sont considérés "des nettoyeurs" des radicaux superoxydes dans les plantes exposées à l'ozone ; pour n'étant pas clairement établi encore le sens physiologique de ces réponses, il a été démontré la stricte corrélation entre l'augmentation polyaminique dans les tissus végétaux et le taux de pollution (Bagni, 1994).

Un autre critère d'évaluation indirecte sur la base de la stimulation des enzymes particulières: de fait l'augmentation de l'activité peroxydasique, paraît être un indicateur très sensible et précoce de la réaction des plantes aux polluants atmosphériques, déjà remarquable en absence de symptômes visibles de dommage (Keller, 1984). L'augmentation des peroxydases est particulièrement significative parce que qu'elles interviennent dans les processus de détoxification et de sénescence. Des mesures de l'activité peroxydasique dans les feuilles des plantes ornementales en sites, à diverses intensités de la circulation des véhicules dans l'aire urbaine et extra urbaine de Turin, ont confirmé l'existence de corrélation positive entre le niveau de pollution et l'activité peroxydasique avec des différences très fortes dans plusieurs

espèces, essences charme et robinia, qui sont promptement réactives (Baraglioni *et al.* 1993). Malheureusement les réponses biochimiques jusqu'à maintenant expérimentées dans le monitoring des PAP sont aspécifiques. Indicatives de l'état général de la pollution, mais elles se prêtent à, distinguer entre plusieurs PAP et, fait encore plus limitatif, puissent subir l'interférence d'autres natures, par exemple les stress hydrique et nutritionnel. Des indications plus spécifiques et précises pourraient être fournies des valeurs de cumuls des PAP dans les tissus. Tenant compte des quantités absorbées du terrain sur lequel, en mesure variable, sont les composants naturels, les concentrations tissulaires de sulphates et fluorures sont en général corrélables au SO₂ ou aux fluorures de l'air.

Particulièrement significative, pour leur corrélation élevée avec la pollution environnementale sont les données du cumul dans les racines et les feuilles des métaux lourds. La charge en métaux lourds dans les tissus végétaux représente un danger pour la santé de l'homme et des animaux insérée dans les plantes au niveau de la chaîne alimentaire mais, d'autre part, peut fournir des éléments utiles de jugement sur les niveaux de pollution par les particules. Des études récemment conduites à Turin (Nicolotti et Bragoloni, 1993) ont mis en évidence au niveau des racines du hêtre des voies urbaines bordées d'arbres, des contenus en métaux lourds, spécialement du Pb, du Cu, et du Zn supérieurs à ceux des racines de hêtre dans les bois.

Ainsi à l'exemple des feuilles de plusieurs espèces des arbres ornementaux de la ville de Budapest, il en est résulté que ces feuilles contiennent des concentrations totales de Fe, Mn, Pb, Cu et Zn de 3 à 10 fois supérieures à celles des mêmes espèces dans les environnements ruraux (Kowacks *et al.* 1982).

21.7 Les plantes comme épuratrices environnementales

Comme c'est indiqué ci-dessus et des informations retrouvables dans la littérature, qui soulignent la capacité des arbres à déplacer de l'environnement des polluants gazeux et des métaux lourds, ainsi ceux dangereux pour la santé humaine, les immobilisant dans leurs tissus. Cette fonction est évidemment dévolue de manière optimale aux grands poumons forestiers. Au service de l'Agence de la Protection Environnementale des Etats Unis (1976), il a été calculé sur 1 ha de forêt attestée sur côtés feuilles (inclus le sol et la végétation) qu'il est en mesure d'absorber sur un an 96.000 t d'O₃., 748 t de SO₂, 2.2 t de CO, 0.38 t d'oxyde d'azote et 0.17 t de peroxyacétylnitrate.

Cependant, l'action dépuratrice dévolue aux plantes ornementales, n'est pas à sous évaluer. Des barrières de haies profondes de 40-50 cm sont en mesure de baisser de 8-10 fois la concentration de Pb de l'air qui les traversen (Smith 1976). La capacité dépuratrice de plusieurs espèces botaniques semble être très différente. Par exemple *Thuja occidentali*, *Taxus baccata* et *Platanus sp*, sont recommandés comme de puissants fixateurs de SO₂, cependant que *Acer campestre*, *Quercus robur* et *Sambucus racemosa*, fixent particulièrement bien les fluorures. L'ailante, le marronnier, le tilleul accumulent des métaux lourds avec une efficience d'interception et de rétention des polluants dépend des différents facteurs, en

particulier de la forme et du port du feuillage, de la forme, de la dimension de la feuille, de la structure de la superficie foliaire, aussi plus absorbante que scabre et/ou poilue. L'on peut retenir que les conifères avec leur feuillage et leurs petites feuilles, allongées développent leur action dépuratrice avec une efficacité particulière (Smith 1964).

L'efficience de la dépuración sur les différents polluants gazeux varie nettement avec leurs natures mêmes, en fonction aussi de leur solubilité dans l'eau, élevée dans le cas pour le HF, SO₂, NO₂ et de la réactivité, particulièrement dans le cas de l'O₃. Malheureusement le monoxyde de carbone beaucoup peu soluble et est très peu retenu et absorbé par les plantes.

Le vert urbain n'est pas une panacée capable de résoudre de manière déterminante le grave problème hygiénique de la pollution. A son action dépuratrice, se joint encore à ses effets bénéfiques des conditions d'humidité, de température et de luminosité dans la prévention d'une amélioration de l'environnement de la cité. Bien que le dommage induit par l'ozone dans les plantes soit amplement étudié durant ces rares décades, le mécanisme du dommage dû à l'ozone soit encore méconnu. Quatre mécanismes possibles pour la formation du dommage de l'ozone dans les plantes pourraient être proposés.

- (1) Le dommage mécanique direct dans les structures cellulaires dû à l'ozone ou ses dérivés, qui conduit à la mort de la cellule ;
- (2) Des effets non désirés dans le métabolisme normal de la cellule dus à l'ozone et ses dérivés, qui perturbe le métabolisme, conduisant à la mort cellulaire ;
- (3) L'induction des mécanismes de défense active et le HR de l'ozone et de ses dérivés dans les cellules, qui conduit à la mort active localisée des cellules ;
- (4) Les réactions de la sénescence prématurée dans les cellules induites par l'ozone ou de ses produits.

Une évidence récente en biochimie et en biologie moléculaire indique que les mécanismes de défense générale dans les plantes induits par l'ozone sont en accord avec les deux dernières hypothèses. Cette évidence montre que l'ozone induit des réactions de défense similaires dans les plantes à celles des autres stress biotiques et abiotiques. Nous sommes portés à spéculer que l'exposition à l'ozone, d'une certaine manière provoque des réactions qui miment quelques événements des réactions incompatibles entre plante-pathogène, conduisant à l'induction active des mécanismes de défense et de la mort localisée de la cellule. L'élucidation des mécanismes du dommage dû à l'ozone dans les plantes, nécessiterait une nouvelle mise au point des instruments et d'une adéquation des connaissances provenant d'autres situations de stress.

Des progrès rapides dans la recherche du dommage dû à l'ozone, pourraient être réalisés avec l'introduction de nouveaux instruments de biochimie et de biologie moléculaire. Beaucoup de gènes importants de la défense provenant des systèmes liés, déjà ont été clonés et caractérisés. L'adaptation de ces techniques d'ingénierie génétique et moléculaire, en dehors de ces quelques prochaines années, pourrait augmenter notre connaissance des mécanismes directs du dommage dû à l'ozone au niveau des plantes. Le clonage des gènes spécifiques induits par l'ozone, l'utilisation de ces gènes comme sonde pour l'expression et

l'analyse de la régulation, et le test de leur rôle direct avec les études de transformation conduiraient finalement à l'identification des gènes responsables de la résistance à l'ozone. Finalement, ces études pourraient aussi favoriser le développement des marqueurs moléculaires spécifiques et hautement sensibles pour le monitoring des dommages dûs à l'ozone dans les plantes.

DIAWARA

Prof Ibrahim DIAWARA
Inspecteur Général de
l'Éducation Nationale
Président de l'Amicale
Sénégal-Italienne (ASI)
Rue 11 x 8 Médina Dakar
DIAWARA

Prof Ibrahim DIAWARA
Inspecteur Général de
l'Éducation Nationale
Président de l'Amicale
Sénégal-Italienne (ASI)
Rue 11 x 8 Médina Dakar
DIAWARA

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aarnes, H., Baumann, C., Eriksen, A.B., Solås, A., Sundbye, A., and Solvernes, K.A. (1993). Photosynthesis in ozone-exposed duckweed (*Lemna gibba*). *Physiol. Plant.* **87**, 256-262.
- Adepipe, N.O., and Ormrod, D.P. (1972). Hormonal control of of ozone phytotoxicity in *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol.* **68**, 254-258.
- Allen R.D. , (1995) , Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants . *Plant Physiol.* **107** , 1049-1054.
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Natori, T., Tanaka, K., and Kondo, N. (1991). Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **32**, 691-697.
- Arntzen C.J. , Penner D. , Dodge A.D. , Nakatani H.Y. and Fuerst E.P. , (1985) , Paraquat Resistance in *Coryza* . *Plant Physiol.* , **77** , 984-989.
-

B

- Beauchamp C. and Fridovich L (1971) , Superoxide Dismutase Improved Assays and Assay Applicable to Acrylamide Gels , *Analytical Biochemistry* , **44** , 276-287.
- Bertini I , Cipolli R. , Tundi P., Monnani R. e Piangoloni A. (1995) , La protezione dell'ambiente in Italia , *DSE* , 1-643 .
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., and Sandermann, H., Jr. (1989). Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochem.* **28**, 1589-1595 .
-

C

- Camilleri P. , Vaughan M.A and Vaughan K.C. , (1989) , Lack of Cross-Resistance of Paraquat Hairy Fleabane (*Coryza bonariensis*) . *Weed Science* , **37** , 5-11.
- Castillo F.J. , Peters J.L. and Heath R.L. , (1988) . Alteration of Extracellular Enzymes in Pinto Bean Leaves upon Exposure to Air Pollutants, Ozone and Sulfur Dioxide . *Plant Physiol.* **89** , 159-164.
- Castillo, F.J., and Heath, R.L. (1990). Ca²⁺ transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure. *Plant Physiol.* **94**, 788-795.
- Castillo, F.J., Miller, P.R., and Greppin, H. (1987). Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* **43**, 111-220.
- Chanway C.P. and Runeckles V.C. , (1984) . The role of superoxide dismutase in the susceptibility of bean leaves to ozone injury . *Can. J. Bot.* **62** , 236-240.
- Chanway, C.P., and Runeckles, V.C. (1984). The role of superoxide dismutase in the susceptibility of bean leaves to ozone injury. *Can. J. Bot.* **62**, 236-240.
- Chevrier, N., Chung, Y.S., and Sarhan, F. (1990). Oxidative damages and repair in *Euglena gracilis* exposed to ozone II. Membrane permeability and uptake of metabolites. *Plant Cell Physiol.* **31**, 987-992.
- Cooley, D.R., and Manning, W.J. (1987). The impact of ozone on assimilate partitioning in plants: A review. *Environ. Pollut.* **47**, 95-113.
-

D

- Dann, M.S., and Pell, E.J. (1989). Decline of activity and quantity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and net photosynthesis in ozone-treated potato foliage. *Plant Physiol.* **91**, 427-432.
- Darrall, N.M. (1989). The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell Environ.* **12**, 1-30.
- Daza M.C. , Sandalio L.M. , Rico Q.M. and Del Río L.A. , (1993) . Isoenzyme Pattern of Superoxide Dismutase in Leaves from Cultivars Susceptible and Resistant to the Rust *Hemileia vastatrix*. *J.Plant Physiol.* **141** , 521-526.

Derwent, R.G. (1990). The long range transport of ozone within Europe and its control. *Environ. Pollut.* **63**, 299-318.

E

Eckey-Kaltenbach, H., Ernst, D., Heller, W., and Sandermann, H., Jr. (1994). Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley plants. *Plant Physiol.* **104**, 67-74.

Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P., and Mullineaux, P.M. (1994). Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* **192**, 137-143.

Elstner, E.F., Osswald, W., and Youngman, R.J. (1985). Basic mechanisms of pigment bleaching and loss of structural resistance in spruce (*Picea abies*) needles: advances in phytomedical diagnostics. *Experientia* **41**, 235-269.

Ernst, D., Bodemann, A., Schmelzer, E., Langebartels, C., and Sandermann, H.J. (1996). β -1,3-glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum* L. cv. BEL W3 after ozone fumigation. *J. Plant Physiol.* **148**, 215-221.

F

Fridovich I., Beyer J.R. and Wayne F., (1987). Assay for Superoxide Dismutase Activity: Some large Consequences of Minor Changes in Conditions. *Analytical Biochemistry.* **161**, 559-566.

G

Galliano, H., Cabané, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Sandermann, H., Jr., and Ernst, D. (1993). Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Mol. Biol.* **23**, 145-156.

Galliano, H., Heller, W., and Sandermann, H.J. (1993). Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochem.* **32**, 557-563.

Gressel J., Driesenaar A.R.J., Jansen M.A.K. and Amsellem Z., (1993), Developmental Variability of Photooxidative Stress Tolerance in Paraquat-Resistant *Conyza*. *Plant Physiol.* **103**, 1097-1106.

Gressel J., Malkin S., Canaani O., Kazzes D., Shaaltiel Y. and Jansen M.A.K., (1989), Increased Tolerance to Photoinhibitory Light in Paraquat-Resistant *Conyza bonariensis* Measured by Photoacoustic Spectroscopy and $^{14}\text{CO}_2$ -Fixation. *Plant Physiol.* **91**, 1174-1178.

Gressel J. and Shaaltiel Y., (1986), Multienzyme Oxygen Radical Detoxifying System Correlated with Paraquat Resistance in *Conyza bonariensis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **26**, 22-28.

Gressel J. and Ye B., (1994), Constitutive variation of ascorbate peroxidase activity during development parallels that of superoxide dismutase and glutathione reductase in paraquat-resistant *Conyza*. *Plant Science*, **102**, 147-151.

Grimes, H.D., Perkins, K.K., and Boss, W.F. (1983). Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological conditions. A spin trapping study. *Plant Physiol.* **72**, 1016-1020.

H

Heath, R.L. (1987). The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of the plant cells. In *Recent Advances in Phytochemistry. Phytochemical Effects of Environmental Compounds*, vol. 21, J.A. Saunders, L. Kosak-Channing, and E.E. Conn, eds. (New York: Plenum Press), pp. 29-54.

Heath, R.L. (1994). Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosyn. Res.* **39**, 439-451.

Heck, W.W., Blum, E.U., Reinert, R.A., and Heagle, A.S. (1983). Effects of air pollution on crop production. In *Strategies of Plant Reproduction*, W.J. Meud, ed. (Granada: Osmum Publishers), pp. 333-350.

Hoigné, J., and Bader, H. (1975). Ozonation of water: role of hydroxyl radicals as oxidizing intermediates. *Science* **190**, 782-784

I

Imberty A. , Goldberg R. and Catesson A.M. , (1985) , Isolation and characterization of Populus isoperoxidases involved in the last step of lignin formation . *Planta* . 164 , 221-226.

K

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., and Karjalainen, R. (1994). Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell Environ.* 17, 783-794.

Kanofsky, J.R., and Sima, P. (1991). Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* 266, 9039-9042.

Kärenlampi, S.O., Airaksinen, K., Miettinen, A.T.E., Kokko, H.L., Holopainen, J.K., Kärenlampi, L.V., and Karjalainen, R.O. (1994). Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce [*Picea abies* (Karst) L.]. *New Phytol.* 126, 81-89.

Keen, N.T., and Taylor, O.C. (1975). Ozone injury in soybeans. Isoflavonoid accumulation is related to necrosis. *Plant Physiol.* 55, 731-733.

Kohut, R.J., Amundson, R.G., Laurence, J.A., Colavito, L., Van, L.P., and King, P. (1987). Effects of ozone and sulfur dioxide on yield of winter wheat. *Phytopath.* 77, 71-74.

Krupa, S.V., and Manning, W.J. (1988). Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* 50, 101-137.

Kubo A. , Saji H. , Tanaka K. and Kondo N. , (1995) . Expression of arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide . *Plant Molecular Biology* 29 , 479-489.

L

Laisk, A., Kull, O., and Moldau, H. (1989). Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol.* 90, 1163-116

Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W., and Sandermann, H., Jr. (1991). Biochemical plant responses to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 95, 882-889.

Lee, T.T. (1968). Effect of ozone on swelling of tobacco mitochondria. *Plant Physiol.* 43, 133-139.

Lehnherr, B., Machler, F., Granmjean, A., and Fuhrer, A.J. (1988). The regulation of photosynthesis in leaves of field-grown spring wheat cv. Albis at different levels of ozone in ambient air. *Plant Physiol.* 88, 1115-1119.

Luwe, M.W.F., Takahama, U., and Heber, U. (1993). Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 101, 969-976.

M

Matta A. and Nicolotti G. , (1996) , Le piante e l'inquinamento dell'aria in città . *Inquinamento*. 3 , 58-62.

Mazzali P. and Zavatti A. (1997) , L'inquinamento atmosferico :Origine, Prevenzione, Controllo , *Inquinamento dell'aria* Pitagora Editrice Bologna , 9, 65-102.

McLaughlin, S.B., and Taylor, G.E. (1981). Relative humidity: Important modifier of pollutant uptake by plants. *Science* 211, 167-169.

Mehlhorn, H. (1990). Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant, Cell Environ.* 13, 971-976.

Mehlhorn, H., and Wellburn, A.R. (1987). Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 327, 417-418.

Mehlhorn, H., O'Shea, J.M., and Wellburn, A.R. (1991). Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible plant injury. *J. Exp. Bot.* 42, 17-24.

Mehlhorn, H., Tabner, B., and Wellburn, A.R. (1990). Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiol. Plant.* 79, 377-383.

Miyake, H., Matsumura, H., Fujinuma, Y., and Totsuka, T. (1989). Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves. *New Phytol.* 111, 187-195.

Mortensen, L.M., and Skre, O. (1990). Effects of low ozone concentrations on growth of *Betula pubescens* Ehrh., *Betula verrucosa* Ehrh. and *Alnus incana* (L.) Moench. *New Phytol.* 115, 165-170.

Myhre, A., Forberg, E., Aarnes, H., and Nielsen, S. (1988). Reduction of net photosynthesis in oats after treatments with low concentrations of ozone. *Environ. Pollut.* 53, 265-271.

N

Nakamura, H., and Saka, H. (1978). Photochemical oxidants injury in rice plants. III. Effect of ozone on physiological activities in rice plants. *Japanese Journal of Crop Sciences* 47, 704-714.

Nie, G.-Y., Tomasevic, M., and Baker, N.R. (1993). Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat. *Plant, Cell Environ.* 16, 643-651.

Overmyer, K., Kangasjärvi, J., Kuittinen, T., and Saarma, M. (1998). Gene expression and cell death in ozone-exposed plants: Is programmed cell death involved in ozone damage in ozone sensitive *Arabidopsis* mutants? In Responses of Plant Metabolism to Air Pollution and Global Change, L. De Kok, and I. Stulen, eds. (Leiden: Backhuys Publishers), p. In Press.

P

Pääkkönen, E., Paasisalo, S., Holopainen, T., and Kärenlampi, L. (1993). Growth and stomatal responses of birch (*Betula pendula* Roth) clones to ozone in open-air and chamber fumigations. *New Phytol.* 125, 615-623.

Pandolfini T., Gabbriellini R. & Comparini C., (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell and Environment* 15, 719-725.

Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A. et Caparrini A., (1986), Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts, *Analytical Biochemistry*, 154, 536-541.

Pauls, K.P., and Thompson, J.E. (1980). In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* 283, 504-506.

Pell, E.J., and Brennan, E. (1973). Changes in respiration, photosynthesis, adenosine 5'-triphosphate, and total adenylate content of ozonated Pinto bean foliage as they relate to symptom expression. *Plant Physiol.* 51, 378-381.

Pell, E.J., and Dann, M.S. (1991). Multiple stress-induced foliar senescence and implications for whole-plant longevity. In Response of Plants to Multiple Stresses, H.A. Mooney, W.E. Winner, and E.J. Pell, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 189-204.

Pell, E.J., Eckardt, N., and Enyedi, A.J. (1992). Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytol.* 120, 397-405.

Pell, E.J., Eckardt, N.A., and Glick, R.E. (1994). Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosyn. Res.* 39, 453-462.

Pell, E.J., Schlaghauer, C.D., and Arteca, R.N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* 100, 264-273.

Pell, E.J., Schlaghauer, C.D., and Arteca, R.N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* 100, 264-273.

Pell, E.J., Temple, P.J., Friend, A.L., Mooney, H.A., and Winner, W.E. (1994). Compensation as a plant response to ozone and associated stresses: An analysis of ROPIS experiments. *J. Environ. Qual.* 23, 429-436.

Penkett, S.A. (1984). Ozone increases in ground-level European air. *Nature* 311, 14-15.

Peters, J.L., Castillo, F.J., and Heath, R.L. (1989). Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiol.* 89, 159-164.

Pitcher, L.H., and Zilinskas, B.A. (1996). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol.* 110, 583-588.

Pitcher, L.H., Brennan, E., and Zilinskas, B.A. (1992). The antiozonant ethylenediurea does not act via superoxide dismutase induction in bean. *Plant Physiol.* 99, 1388-1392.

Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M., and Zilinskas, B.A. (1991). Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 97, 452-455.

Pleijel, H., Ahlfors, A., Skärby, L., Pihl, G., Sellden, G., and Sjödin, Å. (1994). Effects of air pollutant emissions from a rural motorway on *Petunia* and *Trifolium*. *The science of the total environment* 146/147, 117-123.

- Polle, A., Pfirrmann, T., Chakrabarti, S., and Rennenberg, H. (1993). The effects of enhanced ozone and enhanced carbon dioxide concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant, Cell Environ.* 16, 311-316.
- Price, A., Lucas, P.W., and Lea, P.J. (1990). Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: A leaf section approach. *J. Exp. Bot.* 41, 1309-1317.
- Pütter J. Peroxidases, (1975) , Methods of Enzymatics Analysis , Verlag Chemie, Weinheim in :*Bergmeyer .H.U (ed.)*, 685-670.
-

R

- Ranieri A.M. , Lencioni L. , Schenone G. and Soldatini G.F. , (1993) . Glutathione-Ascorbic Acid Cycle in Pumpkin Grown under Polluted Air in Open-top Chambers . *J.Plant Physiol.* 142 , 286-290.
- Rao, M.V., Hale, B.A., and Ormrod, D.P. (1995). Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiol.* 109, 421-423.
- Rao, M.V., Paliyath, G., and Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110, 125-136.
- Reddy, G.N., Arteca, R.N., Dai, Y.-R., Flores, H.E., Negm, F.B., and Pell, E.J. (1993). Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage. *Plant, Cell Environ.* 16, 819-826.
- Reddy, G.N., Dai, Y.-R., Negm, F.B., Flores, H.E., Arteca, R.N., and Pell, E.J. (1991). The effect of ozone stress on the levels of ethylene, polyamines, and rubisco gene expression in potato leaves. In *Active oxygen/Oxidative stress and plant metabolism*, E. Pell, and K. Steffen, eds. (:), pp. 262-267.
- Reich, P.B., and Amudson, R.G. (1985). Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science* 230, 566-570.
- Reiling, K., and Davison, A.W. (1992). Spatial variation in ozone resistance of British populations of *Plantago major* L. *New Phytol.* 122, 699-708.
- Rich, W., Wagoner, P.E., and Tomlinson, H. (1970). Ozone uptake by bean leaves. *Science* 169, 79-80.
- Robinson, J.M., and Rowland, R.A. (1996). Carbohydrate and carbon metabolite accumulation responses in leaves of ozone tolerant and ozone susceptible spinach plants after acute ozone exposure. *Photosyn. Res.* 50, 103-115.
- Rodecap, K.D., and Tingey, D.T. (1983). The influence of light on ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene production from intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 110, 419-427.
- Ropponen, L., and Kärenlampi, L. (1988). Otsonin metsä- ja maatalousvaikutukset. (Kuopio: HAPRO).
- Rosemann, D., Heller, W., and Sandermann, H., Jr. (1991). Biochemical plant responses to ozone II. Induction of stilbene biosynthesis in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 97, 1280-1286.
- Rowland-Bamford, A.J., Borland, A.M., Lea, P.J., and Mansfield, T.A. (1989). The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. *Environ. Poll.* 61, 95-106.
- Runeckles, V.C., and Krupa, S.V. (1994). The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environ. Poll.* 83, 191-213.
-

S

- Sah, D.N., von Tiedemann, A., and Fehrmann, H. (1993). Effects of ozone exposure on resistance of wheat genotypes to *Pyrenophora tritici-repentis*. *J. Phytopath.* 138, 249-256.
- Sakaki, T., Tanaka, K., and Yamada, M. (1994). General metabolic changes in leaf lipids in response to ozone. *Plant Cell Physiol.* 35, 53-62.
- Salter, L., and Hewitt, C.N. (1992). Review article number 71: Ozone-hydrocarbon interactions in plants. *Phytochem.* 31, 4045-4050.
- Sandermann, H., Jr. (1996). Ozone and plant health. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 347-366.
- Schlaghauer, C.D., Arteca, R.N., and Pell, E.J. (1993). Ozone stress induces the expression of ACC synthase in potato plants. *Plant Physiol.* 102(S), 131.

- Schlaghaufer, C.D., Glick, R.E., Arteca, R.N., and Pell, E.J. (1995). Molecular cloning of an ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA and its relationship with a loss of *rbcS* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Mol. Biol.* **28**, 93-103.
- Schmieden, U., and Wild, A. (1995). The contribution of ozone to forest decline. *Physiol. Plant.* **94**, 371-378.
- Schneiderbauer, A., Back, E., Sandermann, H., Jr., and Ernst, D. (1995). Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech. *New Phytol.* **130**, 225-230.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C., and Sandermann, H., Jr. (1992). Biochemical plant responses to ozone III. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1321-1328.
- Schraudner, M., Langebartels, C., and Sandermann, H. (1997). Changes in the biochemical status of plants cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol. Plant.* **100**, 274-280.
- Schraudner, M., Langebartels, C., and Sandermann, H.J. (1996). Plant defense systems and ozone. *Biochem. Soc. Transactions* **24**, 456-461.
- Schubert, R., Fisher, R., Hain, R., Schreier, P.H., Bahnweg, G., Ernst, D., and Sandermann, H., Jr. (1997). An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol. Biol.* **34**, 417-426.
- Seel W.E. , Hendry G.A.F. and Lee J.A. , (1992), Effects of dessication on some activated oxygen processing, enzymes and antioxidants in mosses . *J.Exp.Bot.* **43** , 1031-1037.
- Sen Gupta, A., Alsher, R.G., and McCune, D. (1991). Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol.* **96**, 650-655.
- Sevilla F. , Del Río A. , Hernández J.A. , (1994) , . Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytol.* **126** , 37-44.
- Sharma, Y., and Davis, K. (1994). Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **105**, 1089-1096.
- Sharma, Y.K., and Davis, K.R. (1995). Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. *Plant Mol. Biol.* **29**, 91-98.
- Sharma, Y.K., León, J., Raskin, L., and Davis, K.R. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5099-5104.
- Sutinen, S., Skärby, L., Wallin, G., and Sellden, G. (1990). Long-term exposure of norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open-top chambers. II. Effects on ultrastructure of needles. *New Phytol.* **115**, 345-355.

T

- Talvinen, J., Kangasjärvi, J., Kreibaum, A., Ernst, D., Langebartels, C., and Sandermann, H. (1993). Regulation of polyamine and ethylene pathways by the air pollutant ozone. In Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences, 14: Proceedings of the First Finnish Conference of *Environmental Sciences*, J. Tuomisto, and J. Ruuskanen, eds. (Kuopio: University of Kuopio), pp. 135-138.
- Talvinen, J., Pellinen, R., Julkunen-Tiitto, R., Eloranta, T., Karjalainen, R., and Kangasjärvi, J. (1993). Ozone-induced changes in the expression of the genes encoding regulatory enzymes for polyamine, ethylene and phenylpropanoid metabolisms in ozone tolerant and sensitive birch (*Betula pendula*) clones. *Plant Physiol.* **102** Suppl, 131.
- Talvinen, J., Pellinen, R., Roy, S., Eloranta, T., -Julkunen-Tiitto, R., and Kangasjärvi, J. (1994). Ozone induction of birch (*Betula pendula* Roth.) defense mechanisms at biochemical and gene expression level. *Biologia Plantarum* **36**, 358.
- Tanaka, K., Machida, T., and Sugimoto, T. (1990). Ozone tolerance and glutathione reductase in tobacco cultivars. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1061-1062.
- Tanaka, K., Saji, H., and Kondo, N. (1988). Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone. *Plant Cell Physiol.* **29**, 637-642.
- Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N., and Sugahara, K. (1985). O₃ tolerance and the ascorbate dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1425-1431.

- Taylor, G.E.** (1994). Plant and environment Interactions- Role of genotype in the response of loblolly pine to tropospheric ozone: Effects at the whole-tree, stand and regional level. *J. Environ. Qual.* **23**, 63-82.
- Taylor, G.E., Jr., Ross-Todd, B.M., and Gunderson, C.A.** (1988). Action of ozone on foliar gas exchange in *Glycine max* L. Merr: a potential role for endogenous stress ethylene. *New Phytol.* **110**, 301-307.
- Telewski, F.W.** (1992). Ethylene production by different age class ponderosa and Jeffery pine needles as related to ozone exposure and visible injury. *Trees* **6**, 195-198.
- Tepperman, J.M., and Dunsmuir, P.** (1990). Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* **14**, 501-511.
- Thalmair, M., Bauw, G., Thiel, S., Doehring, T., Langebartels, C., and Sandermann, H.** (1996). Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *J. Plant Physiol.* **148**, 222-228.
- Thomson, W.W., Dugger, W.M., and Palmer, R.L.** (1966). Effects of ozone on the fine structure of the palisade parenchyma cells of bean leaves. *Can. J. Bot.* **44**, 1677-1682.
- Tingey, D.T., Standley, C., and Field, R.W.** (1976). Stress ethylene evolution: a measure of ozone effects on plants. *Atmospheric environment* **10**, 969-974.
- Tokarska-Schlattner, M., Fink, A., Castillo, F.J., Crespi, P., Crevecoeur, M., Greppin, H., and Tacchini, P.** (1997). Effects of ozone on the plasma membrane proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) leaves. *Plant, Cell Environ.* **20**, 1205-1211.
- Torsethaugen, G., Pitcher, L.H., Zilinskas, B.A., and Pell, E.J.** (1997). Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiol.* **114**, 529-537.
- Tuomainen, J., Betz, C., Kangasjärvi, J., Ernst, D., Langebartels, C., and Sandermann, H., Jr.** (1997). Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential transcript accumulation for the biosynthetic enzymes. *Plant J.* In Press.
- Tuomainen, J., Pellinen, R., Roy, S., Kiiskinen, M., Eloranta, T., Karjalainen, R., and Kangasjärvi, J.** (1996). Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *J. Plant Physiol.* **148**, 179-188.
-

V

- van der Straeten, D., Djudzman, A., van Caeneghem, W., Smalle, J., and van Montagu, M.** (1993). Genetic and physiological analysis of a new locus in *Arabidopsis* that confers resistance to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene and specifically affects the ethylene signal transduction pathway. *Plant Physiol.* **102**, 401-408.
- von Tiedemann, A.** (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 151-166.
- von Tiedemann, A., Ostländer, P., Firsching, K.H., and Fehrmann, H.** (1990). Ozone episodes in Southern lower Saxony (FRG) and their impact on the susceptibility of cereals to fungal pathogens. *Environ. Pollut.* **67**, 43-59.
-

W

- Wegener, A., Gimbel, W., Werner, T., Hani, J., Ernst, D., and Sandermann, H., Jr.** (1997). Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase. *Bioch. Bioph. Acta* **1350**, 247-252.
- Weinstein, D.A., and Yanai, R.D.** (1994). Integrating the effects of simultaneous multiple stresses on plants using the simulation model TREGRO. *J. Environ. Qual.* **23**, 418-428.
- Wellburn A.R , Paul N.D. ,** (1994) , The relative implications of ozone formation both in the stratosphere and the troposphere . *Proceedings of the Royal Society of Edinburg.* **1028** , 33-47.
- Wellburn, F.A.M., and Wellburn, A.R.** (1994). Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis* (Mill.). *J. Exp. Bot.* **45**, 607-614.

Wellburn, F.A.M., and Wellburn, A.R. (1996). Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant, Cell Environ.* **19**, 754-760.

Wenzel, A.A., Schlautmann, H., Jones, C.A., Küppers, K., and Mehlhorn, H. (1995). Aminoethoxyvinylglycine, cobalt and ascorbic acid all reduce ozone toxicity in mung beans by inhibition of ethylene biosynthesis. *Physiol. Plant.* **93**, 286-290.

Werner W., Grey H.G., Wilinger, H., (1970)., Über die Eigenschaften eines neues Chromogens fuer die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD Methode , *Zeitung Analytische chemie* , **252.**, 224-248.

Willekens, H., Van Camp, W., van Montagu, M., Inzé, D., Langebartels, C., and Sandermann, H., Jr. (1994). Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol.* **106**, 1007-1014.

Wingsle, G., Mattson, A., Ekblad, A., Hällgren, J.-E., and Selstam, E. (1992). Activities of glutathione reductase and superoxide dismutase in relation to changes of lipids and pigments due to ozone in seedlings of *Pinus sylvestris* (L.). *Plant Sci.* **82**, 167-178.

Woodbury, P.B., Laurence, J.A., and Hudler, G.W. (1994). Chronic ozone exposure increases the susceptibility of hybrid *Populus* to disease caused by *Septoria musiva*. *Environ. Poll.* **86**, 109-114.

Wulff, A., Hänninen, O., Tuomainen, A., and Kärenlampi, L. (1992). Open-air exposure of plants to ozone in Kuopio; analysis of methods. *Ann.Bot.Fenn.* **29**, 263-26.

Y

Yalpani, N., Enyedi, A.J., León, J., and Raskin, I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**, 372-376.

Yin, Z.-H., Langebartels, C., and Sandermann Jr., H. (1994). Specific induction of ethylene biosynthesis in tobacco plants by the air pollutant, ozone. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* **102B**, 127-130.

Z

Zeuthen, J., Mikkelsen, T.N., Paludan-Muller, G., and Ro-Poulsen, H. (1997). Effects of increased UV-B radiation and elevated levels of tropospheric ozone on physiological processes in European beech (*Fagus sylvatica*). *Physiol. Plant.* **100**, 281-290.



Amicale Sénégalaise-Italienne

Riconoscimento dal Governo Senegalese N° 3203 / MINT / DAGT
del 24 - 02 - 1976

Agréée par l'Ambassade d'Italie - Dakar - Sénégal
77 630 74 08 / 76 586 35 28

Dakar, le 06 février 2012

CERTIFICATION

Je soussigné Professeur Ibrahima DIAWARA, Maître de Conférence, Enseignant d'italien à la Faculté de Lettres Université Cheikh Anta Diop de Dakar, traducteur d'italien agréé par l'Ambassade d'Italie à Dakar (Sénégal) certifie que la traduction de la thèse de Monsieur Cheikh Tidiane DIOP est conforme à l'original :

« IL RUOLO DEGLI ENZIMI DETOSSIFICANTI NELLE RISPOSTA DELLE PIANTE ALL'OZONO »

En foi de quoi, on délivre la présente certification pour servir et valoir ce que de droit.

Prof. Ibrahima DIAWARA

Prof Ibrahima DIAWARA
Inspecteur Général de
l'Education Nationale
Président de l'Amicale
Sénégalaise Italienne (ASI)
Rue 11 x 8 Médina Dakar

Rue 11 x 8 Médina - ☎ : 77 630 74 08 / 76 586 35 28

Dakar-SENEGAL

E-mail : iboudiawara@hotmail.com

PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES IN BEAN IN RESPONSE TO OZONE

C.T. Diop¹, C. Nali², L. Messori¹, D. Heimler³ and G. Lorenzini²

¹ Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, via G. Capponi 7, 50121 Firenze, Italy

² Sez. Patologia Vegetale, Dipartimento CDSL, Università di Pisa, via del Borghetto 80, 56124 Pisa, Italy

³ Dipartimento Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta, Università di Firenze, Piazzale delle Cascine 15, 50144 Firenze, Italy

SUMMARY

After treatment with a pulse of ozone (120 ppb, 4 h), enzymatic activities involved in the detoxification of reactive oxygen species [superoxide dismutase (SOD), total peroxidase (PX), ascorbate peroxidase (APX), siringaldazine peroxidase (SPX) and guaiacol peroxidase (GPX)] were determined in the primary leaves of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris*), which on the basis of macroscopic responses were designated ozone-sensitive (cv. Pinto) and ozone-resistant (cv. Groffy). Although slightly higher in the sensitive cultivar, all PX activities were found to be at nearly comparable levels in the untreated plants of both cultivars; however for SOD, constitutive levels were about twice as high in the resistant cultivar. The response to ozone developed rather slowly, being maximal after 48-96 h. Exposure to ozone caused a large increase of SOD and PX activities in the sensitive Pinto, and smaller variations in the resistant Groffy. The largest variations (up to 7-11 fold increases) were observed for APX, SPX and SOD activities in Pinto. We conclude that the induction of antioxidant enzymes does not represent a major defence mechanism against ozone in bean, but appears to be a secondary consequence of ozone injury.

RIASSUNTO

ATTIVITÀ PEROSSIDASICA E SUPEROSSIDO DISMUTASICA IN FAGIOLO IN RISPOSTA ALL'OZONO. Attività enzimatiche ritenute implicate nella detossificazione delle specie attive di ossigeno [superossido dismutasi (SOD), perossidasi totali (PX), ascorbato perossidasi (APX), siringaldazina perossidasi (SPX) e guaiacolo perossidasi (GPX)] sono state determinate 0, 4, 24, 48 e 96 h dopo l'inizio di una fumigazione con ozono (120 ppb per 4 h) nelle foglie primarie di due cultivar di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*), che - sulla base della risposta macroscopica -

erano indicate come ozono-sensibile (cv. Pinto) e ozono-resistente (cv. Groffy). Tutte le attività PX risultavano a livelli comparabili nel materiale non trattato, anche se leggermente superiori nella cultivar sensibile; il contrario era vero per SOD. L'esposizione ad ozono causava un notevole incremento delle attività SOD e PX nelle piante di Pinto e minime variazioni nelle resistenti Groffy. Le variazioni massime (incrementi fino a 7-11 volte) erano osservate per APX, SPX e SOD in Pinto. In fagiolo, l'induzione di attività enzimatiche ad azione antiossidante non costituisce il principale meccanismo di difesa dall'ozono; essa sembra essere, piuttosto, una conseguenza del danno provocato dall'inquinante.

Key words: antioxidants, Halliwell-Asada cycle, O₃ uptake, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUCTION

Oxidative stress by ozone (O₃) in plants has been extensively investigated in recent years. Toxicity of O₃ derives from its high redox potential which leads to the formation of the so called 'reactive oxygen species' (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide radicals, hydroxyl radicals and singlet molecular oxygen. These species are highly destructive: they react quickly and indiscriminately with biomolecules mainly causing lipid peroxidation and ozonolysis, and protein denaturation, which in turn cause impairment of fundamental metabolic processes (Heath, 1994). For some time now differential responses to O₃ have been described, dependent both on environmental influences and on genotype. Apart from exclusion mechanisms (based on differential stomatal absorption of the pollutant) and from repair processes (which involve resynthesis of macromolecules which have been damaged), partial insensitivity to O₃ is based on the biochemical ability to counteract oxidative stress or to prevent the formation of injurious molecules ('tolerance').

As oxidative stress is a feature of all aerobic organisms, they have evolved an impressive array of protective mechanisms designed to keep these deleterious re-

Corresponding author: G. Lorenzini
Fax +39 50 960622
E-mail glorenz@agr.unipi.it

actions to a minimum. For instance, ROS are by-products of electron transport in chloroplasts, mitochondria and plasma membranes (Salin, 1987; Winston, 1990). These protective mechanisms include induction of specific antioxidant enzymes and synthesis of scavengers such as polyamines, ascorbic acid and glutathione, which compete for the radicals and remove them from the reaction (Kangasjaervi *et al.*, 1994).

Undoubtedly, a crucial role in the defense against O₃ injury can be played by oxidative stress enzymes, particularly: superoxide dismutases (SOD) along with catalases and peroxidases (PX), that act on the end product (H₂O₂) of SOD activity. It has been reported that O₃ increases the activities of several of these enzymes and this induction is considered a protective reaction of plants against this pollutant (and others) (Lee and Bennett, 1982; Bowler *et al.*, 1992; Tanaka, 1994). However, contradictory reports exist and whether this increase is actually part of a defence response or is a secondary consequence of injury is a subject of debate. Increases in activity are sometimes greatest in plants that show highest sensitivity to O₃ (Curtis *et al.*, 1976; Tuomainen *et al.*, 1996).

Working with a single kind of plant (in terms of resistance/sensitivity) may be limiting, as the biochemical variations observed may not be attributable to a single mechanism. Differential systems, such as cultivars of plant species showing strong differences in response to standard exposures to O₃ provide a useful tool to investigate mechanisms of toxicity and defence. In the present work we aimed to study the enzymatic responses of two bean cultivars exposed to O₃ under controlled conditions. Particular attention was paid to Cu/Zn SOD (the predominant class in young bean leaves; Chanway and Runeckles, 1984), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and syringaldazine peroxidase (SPX). The first three enzymes play a role in detoxifying superoxides and H₂O₂, respectively; the last one is involved in lignin biosynthesis. In more detail, PXs catalyze two reactions: (i) the reduction of H₂O₂ by ascorbate to form dehydro-ascorbate (basic PX, ascorbate-linked PX, Thom and Maretzki, 1985); (ii) the reaction with cinnamic acid (acidic PX, involved with lignification, syringaldazine-linked PX, Heath, 1988).

MATERIALS AND METHODS

Plant material and fumigation treatment. Two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were selected: Pinto, O₃-sensitive (which is used to detect the presence of O₃ - Oshima, 1974) and Groffy, O₃-resistant (Tonnejick, 1983). Seeds were germinated in a greenhouse, trans-

ferred to containers and maintained under ordinary agronomic conditions. After 15 days, the plants were selected for uniformity. Exposures to O₃ were carried out in a controlled environment fumigation apparatus (Lorenzini *et al.*, 1994) when plants had the primary (unifoliate) leaves fully expanded. The fumigation system was continuously ventilated with charcoal-filtered air maintaining two complete air changes per min. Temperature was maintained at 20 ± 1°C, R.H. 85 ± 5% (vpd 0.4 kPa), PAR 530 µmol m⁻² s⁻¹, 14 h per day photoperiod. O₃ was generated by electric discharge with a Fischer 500 air-cooled apparatus supplied with pure oxygen, and mixed with the inlet air entering the fumigation chamber; its concentration in the chamber was continuously monitored with a photometric Monitor Labs analyzer, model 8810, connected to a PC. Standard fumigations lasted 4 h and the target O₃ constant concentration was 120 ppb (235 µg m⁻³ at standard temperature and pressure). Plants were pre-adapted to the chamber conditions for 24 h. Control plants were maintained in charcoal-filtered air. Fumigated plants were maintained in the same growth chamber. Fifteen plants of each cultivar were used in each test. The experiment was replicated twice.

Calculation of O₃ uptake. The O₃ influx (F_{O₃}) was calculated according to the following flux equation (Fick's law) (Unsworth, 1982):

$$F_{O_3} = \Delta[O_3] \times g_{O_3} \quad (1)$$

where $\Delta[O_3]$ is the difference between O₃ concentrations in air and inside the leaf. This latter was assumed to be zero (Laisk *et al.*, 1989). The conductance for O₃ (g_{O₃}) was completely ascribed to the stomatal component, which was calculated multiplying the conductance for water vapour by 0.613, the ratio of the binary diffusivities of water vapour and O₃. Stomatal conductance was determined with a diffusion porometer (LI-COR 700). Uptake through the cuticle was ignored, because the cuticle is highly impermeable to O₃ when compared to open stomata (Kerstiens and Lenzian, 1989). Boundary layer resistance was neglected as the leaves were kept fluttering slightly by air circulation during the entire fumigation time. Cumulative O₃ uptake for the entire fumigation period was estimated by integration of Equation 1.

Protein extraction. Whole primary leaves were collected at the end of the fumigations and after 24, 48 and 96 h. The midvein was removed, and samples were homogenized with an Omnimixer Ultra Turax (10,000 rpm for 1 min) in 66 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 100 mM NaCl (1 g leaf powder in 5 cm³ of ice

cold buffer). After filtration through Miracloth (Calbiochem) the material was centrifuged at 10,000 g for 10 min. All operations were performed at 4°C. Aliquots of the supernatant were used to measure the enzymatic activities. Protein concentration of the enzyme extract was determined by the protein-dye binding method with BSA as the standard (Bradford, 1976).

Determination of enzymatic activities. SOD activity was determined by the xanthine oxidase cytochrome c method, according to McCord and Fridovich (1969). SOD activity of bean leaf extract is nearly completely inhibited by the presence of 2 mM potassium cyanide, implying that it must be predominantly ascribed to Cu/Zn SOD (Hassan and Scandalios, 1990). Total PX activity was monitored using 2,2'-azino di-[3-ethyl-benzothiazoline-(6)sulphonic acid] as a substrate, according to Werner *et al.* (1970). The reaction was carried out at pH 6.0, in the presence of 2 mM ABTS and 1 mM H_2O_2 and monitored spectrophotometrically at 405 nm. The absorbance increase at this wavelength corresponds to the formation of the ABTS+ cation, which is produced by the reaction. GPX activity was determined in a reaction mixture that contained 50 mM NaH_2PO_4 (pH 6.1), 16 mM guaiacol, 2 mM H_2O_2 and 10 μ l of leaf extract (Castillo and Greppin, 1986). The activity was measured by monitoring the increase in absorbance at 470 nm during the polymerization of guaiacol to tetraguaiacol. APX activity was determined in a reaction mixture (1 cm^3) which contained 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.0) 0.1 mM EDTA, 0.5 mM ascorbic acid, 0.1 mM H_2O_2 and 20 μ l of leaf extract. The activi-

ty was measured by monitoring the rate of ascorbate oxidation at 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Luwe *et al.*, 1993). SPX activity was assayed in 100 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.6 mM H_2O_2 and 0.1 mM syringaldazine dissolved in methanol/dioxane 1:1. The increase in absorbance was monitored at 530 nm (Pandolfini *et al.*, 1992). For all but SPX enzymatic activities, one international unit was calculated as the enzyme quantity that transforms 1 μ mol of substrate in 1 min. For SPX, one arbitrary unit was calculated as the variation of absorbance ($\Delta A_{530} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$, Ranieri *et al.*, 1995).

RESULTS

Visible injury. As expected, only the sensitive cv. Pinto showed visible injury, in the form of small white necrotic lesions (flecks), confined to the interveinal margins of the upper leaf surface (Craker and Starbuck, 1972). These symptoms appeared about 24 h after fumigation.

Ozone uptake. O_3 uptake during the fumigation was rather similar in the two cultivars (Fig. 1). Estimated cumulative uptake was $345 \pm 92.2 \text{ mmol } O_3 \text{ m}^{-2}$ in Pinto vs $330 \pm 6.8 \text{ mmol } O_3 \text{ m}^{-2}$ in Groffy ($P > 0.05$, Student's *t*-test).

Total protein content. The total leaf extractable protein content did not change significantly in response to O_3 exposure (data not shown).

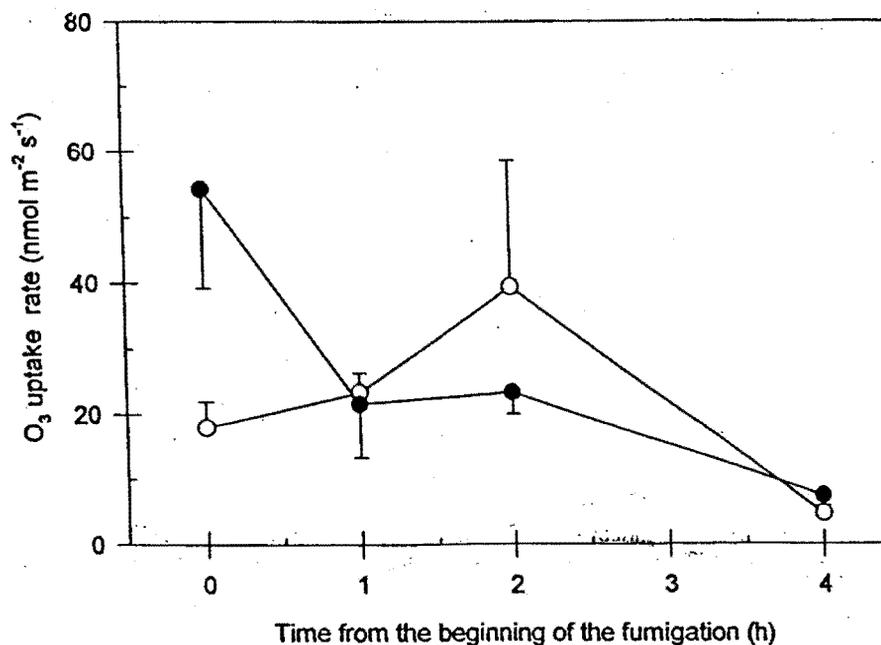


Fig. 1. Time course of ozone uptake during the fumigation (120 ppb, 4 h) in bean cv. Pinto (open circles) and cv. Groffy (closed circles); vertical bars represent SD (where they do not appear, their value is negligible).

Superoxide dismutase activity. Under non-stress conditions, Cu/Zn SOD specific activity (*i.e.* referred to the protein content) in Groffy was about twice that in Pinto (53.0 ± 3.00 vs 25.3 ± 6.51 U mg⁻¹ protein, $P < 0.01$, Student's *t*-test). Following exposure to O₃, a dramatic increase in SOD activity was observed in Pinto (9 fold increase) within 48 h after the treatment (Fig. 2). Two days later, the activity decreased, although it remained about 7 times higher than the background. In contrast, the Cu/Zn SOD activity in cv. Groffy only showed minimal variations as a result of fumigation.

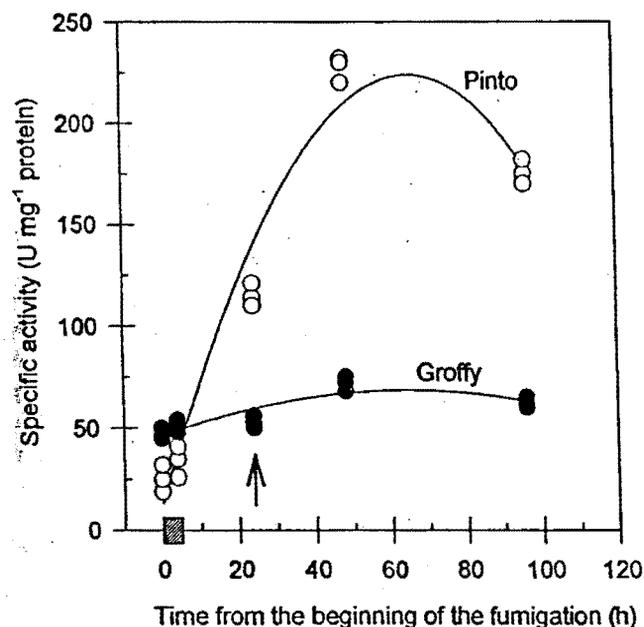


Fig. 2. Time course of superoxide dismutase activity in leaf extracts of bean, cvs Pinto (open circles) and Groffy (closed circles) exposed to 120 ppb ozone for 4 h. The dashed box on the abscissa indicates the fumigation period. The arrow indicates the appearance of visible injury on the sensitive Pinto plants. Each point represents the average of the replicates within each experiment.

Total peroxidase activity. Background levels of specific PX activity were slightly different in the two cultivars (2.5 ± 0.25 U mg⁻¹ protein in Pinto vs 1.8 ± 0.24 in Groffy, $P < 0.05$, Student's *t*-test). Exposure to O₃ caused in Pinto a sharp but temporary increase in PX activity, which reached a three fold increase 48 h after the beginning of fumigation (Fig. 3). PX activity was twice that of the background 96 h after the beginning of fumigation. The behaviour of Groffy was different: a progressive increase was observed from the end of fumigation, with a maximum 2.4-fold increase above background at 96 h.

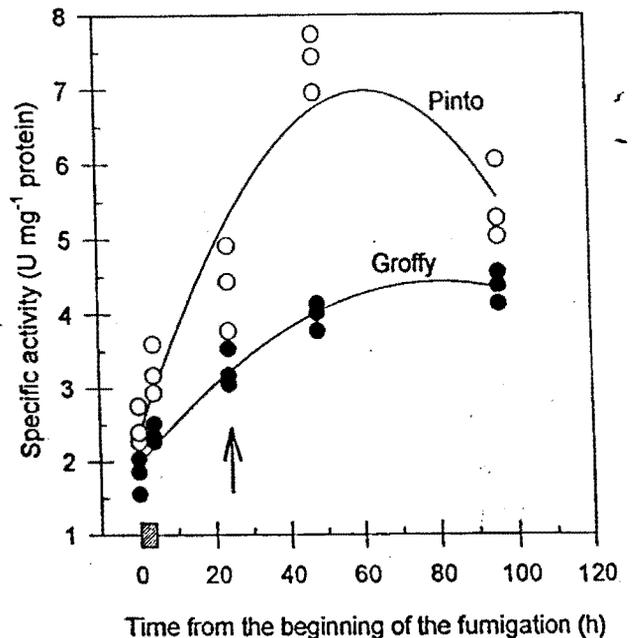


Fig. 3. Time course of total peroxidase activity in leaf extracts of bean, cvs Pinto (open circles) and Groffy (closed circles) exposed to 120 ppb ozone for 4 h. The dashed box on the abscissa indicates the fumigation period. The arrow indicates the appearance of visible injury on the sensitive Pinto plants. Each point represents the average of the replicates within each experiment.

Electron-donor-specific peroxidase activities. Minimal differences in the specific activities monitored were detected in the background values of the two cultivars. While no apparent effect was induced by fumigation in Groffy, APX activity in ozonated leaves of Pinto, at the end of the experimental period, was 11.4 times higher than the background (Fig. 4, A). In the same way, GPX activity was stimulated by O₃ treatment especially in Pinto, with an increase over background which reached a factor of about 4. Only a slight increase was observed in Groffy (Fig. 4, B). Fumigation also stimulated SPX activity in Pinto much more than in Groffy (Fig. 4, C).

DISCUSSION

As O₃ uptake in the two cultivars was very similar, their differential response is not related to an exclusion mechanism, in agreement with the report of Hucl *et al.* (1982). Biochemical mechanism(s) should therefore be involved. Physiological and genetic evidence indicates that ROS scavenging systems should play an important role in stress protection (Pell and Reddy, 1991).

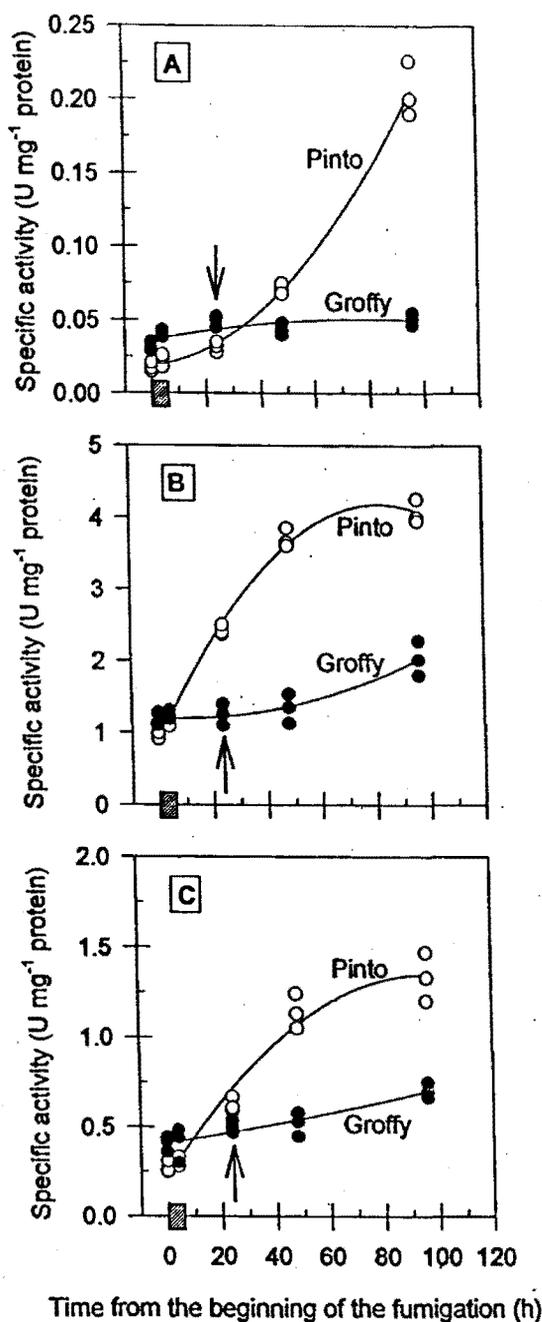


Fig. 4. Time course of ascorbate- (A), guaiacol- (B) and syringaldazine- (C) peroxidase activities in leaf extracts of bean, cvs Pinto (open circles) and Groffy (closed circles) exposed to 120 ppb ozone for 4 h. The dashed box on the abscissa indicates the fumigation period. The arrow indicates the appearance of visible injury on the sensitive Pinto plants. Each point represents the average of the replicates within each experiment.

Previous investigations on bean have shown PX increases as a consequence of exposure to O_3 (e.g. Astorino *et al.*, 1995; Brunschoen-Harti *et al.* 1995). In our work, significant increases of the enzymatic activities in-

vestigated (*i.e.* Cu/Zn SOD, total PX, APX, GPX, SPX) were clearly observed only in the O_3 -sensitive cultivar. The increase of APX activity in Pinto occurred 48 h after fumigation, clearly after the appearance of symptoms. The increases of GPX and SPX were concomitant or occurred soon after the symptoms. Rather similar results have been obtained for APX in tobacco and GPX in *Arabidopsis thaliana* by Willekens *et al.* (1995) and Kubo *et al.* (1995), respectively, but not for APX in *A. thaliana*, whose activity was enhanced before the appearance of symptoms (Kubo *et al.*, 1995).

The fact that PX activities were induced more rapidly and intensively in the O_3 -sensitive than in the resistant plants, only in concomitance or after the appearance of symptoms, strongly suggests, in agreement with the results of previous work (Dass and Weaver, 1972; Endress *et al.*, 1980; Bender *et al.*, 1990) that increased PX is a secondary consequence of O_3 -induced injury. Unfortunately the usefulness of PX as a quantitative marker of O_3 injury seems to be minimal, due to the interference of other environmental factors (Petolino *et al.*, 1983).

Constitutive levels of SOD activity in the untreated resistant plants were about twice those found in the sensitive ones. The significance of this finding should be established with an higher number of bean cultivars. No correlation was found between O_3 sensitivity and constitutive levels of SOD in ten bean cultivars (McKersie *et al.*, 1982). The huge differences in O_3 sensitivity in tobacco between cv. Bel-W3 (supersensitive) and Bel-B (resistant) are not related to basic differences in SOD and APX levels (Tanaka *et al.*, 1990). Tanaka *et al.* (1985) found no remarkable differences in constitutive SOD, GPX and APX activities among six spinach cultivars differing in response to O_3 .

SOD activity has been similarly enhanced by O_3 in a resistant and in a sensitive cultivar (McKersie *et al.*, 1982) and increases in SOD have been related to O_3 tolerance in snapbean (Lee and Bennett, 1982). Our results confirm the strong association between injury induced by O_3 and SOD activity found by Pitcher *et al.* (1992). SOD activities in response to O_3 in other plants may vary in a conflicting fashion and there is no clear evidence for SOD involvement in O_3 resistance (Bowler *et al.*, 1992). The view that induction of antioxidant enzymes does not represent a major defence system against O_3 in bean is thus reinforced by the present work.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the University of Pisa (Fondi di Ateneo) and by CNR, Rome (Coordinate Project INGA).

REFERENCES

- Astorino G., Margani I., Tripodo P., Manes F., 1995. The response of *Phaseolus vulgaris* L., cv. Lit to different dosages of the anti-ozonant ethylenediurea (EDU) in relation to chronic treatment with ozone. *Plant Science* 111: 237-248.
- Bender J., Weigel H.-J., Jaeger H.-J., 1990. Regression analysis to describe yield and metabolic responses of beans (*Phaseolus vulgaris*) to chronic ozone stress. *Angewandte Botanik* 64: 329-343.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzè D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brunschon-Harti S., Fangmeier A., Jaeger H.-J., 1995. Effects of ethylenediurea and ozone on the antioxidative systems in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environmental Pollution* 90: 95-103.
- Castillo, F.J., H. Greppin, 1986. Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analyses by high-performance liquid chromatography. *Physiologia Plantarum* 68: 201-208.
- Chanway C.P., Runeckles V.C., 1984. The role of superoxide dismutase in the susceptibility of bean leaves to ozone injury. *Canadian Journal of Botany* 62: 236-240.
- Craker L.E., Starbuck J.S., 1972. Metabolic changes associated with ozone injury of bean leaves. *Canadian Journal of Plant Sciences* 52: 589-597.
- Curtis C.R., Howell R.K., Kremer O.F., 1976. Soybean peroxidase from ozone injury. *Environmental Pollution* 11: 189-194.
- Dass H.C., Weaver G.M., 1972. Enzymatic changes in intact leaves of *Phaseolus vulgaris* following ozone fumigation. *Atmospheric Environment* 6: 759-763.
- Endress A.G., Suarez J.S., Taylor C.C., 1980. Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl or ozone. *Environmental Pollution* 22: 47-58.
- Hassan H.M., Scandalios J.G., 1990. Superoxide dismutase in aerobic organisms. In: Alscher R.G., Cummings J.R. (eds). Stress responses in plants: adaptation and acclimatation mechanisms, pp. 175-199. Wiley-Liss, New York, NY, USA.
- Heath R.L., 1988. Biochemical mechanisms of pollutant stress. In: Heck W.W., Taylor O.C., Tingey D.T. (eds). Assessment of crop loss from air pollutants, pp. 259-286. Elsevier, London, UK.
- Heath R.L., 1994. Alterations of plant metabolism by ozone exposure. In: Alscher R.G., Wellburn A.R. (eds). Plant responses to the gaseous environment. Molecular, metabolic and physiological aspects, pp. 121-145. Chapman & Hill, London, UK.
- Hucl P., Beversdorf W.D., McKersie B.D., 1982. Relationship of leaf parameters with genetic ozone insensitivity in selected *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Canadian Journal of Botany* 60: 2187-2191.
- Kangasjaervi J., Talvinen J., Utriainen M., Karjalainen R., 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17: 783-794.
- Kerstiens G., Lenzian K.J., 1989. Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytologist* 112: 13-19.
- Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N., 1995. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* 29: 479-489.
- Laisk A., Kull O., Moldau H., 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167.
- Lee E.H., Bennett J.H., 1982. Superoxide dismutase - A possible protective enzyme against ozone injury in snapbeans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 69: 1444-1449.
- Lorenzini G., Medeghini Bonatti P., Nali C., Baroni Fornasiero R., 1994. The protective effect of rust infection against ozone, sulphur dioxide and paraquat toxicity symptoms in broad bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 263-279.
- Luwe M.W.F., Takahama U., Heber U., 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101, 969-976.

- McCord J.M., Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.
- McKersie B.D., Beversdorf W.D., Hucl P., 1982. The relationships between ozone insensitivity, lipid-soluble antioxidants, and superoxide dismutase in *Phaseolus vulgaris*. *Canadian Journal of Botany* 60: 2686-2691.
- Oshima R.J., 1974. A viable system of biological indicators for monitoring air pollutants. *Journal of Air Pollution Control Association* 24: 576-578.
- Pandolfini T., Gabbriellini, R. Comparini C., 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell and Environment* 15: 719-725.
- Pell E.J., Reddy G.N., 1991. Oxidative stress and its role in air pollution toxicity. In: Pell E.J., Steffen K.L. (eds). Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, pp. 67-75. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MA, USA.
- Petolino J.F., Mulchi C.L., Aycock M.K. Jr., 1983. Leaf injury and peroxidase activity in ozone-stressed tobacco cultivars and hybrids. *Crop Science* 23: 1102-1106.
- Pitcher L.H., Brennan E., Zilinskas B.A., 1992. The antiozonant ethylenediurea does not act via superoxide dismutase induction in bean. *Plant Physiology* 99: 1388-1392.
- Ranieri A., Nali C., D'Urso G., 1995. Peroxidase activity in *Cucurbita pepo* L. leaves exposed to ozone. In: Lorenzini G., Soldatini G.F. (eds). Responses of plants to air pollution: Biological and economic aspects, 47-54. Pacini, Pisa, Italy.
- Salin M.L., 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* 72: 681-689.
- Tanaka K., 1994. Tolerance to herbicides and air pollutants. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants, pp. 365-378. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Tanaka K., Machida T., Sugimoto T., 1990. Ozone tolerance and glutathione reductase in tobacco cultivars. *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 1061-1062.
- Tanaka K., Suda Y., Kondo N., Sugahara K., 1985. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 26: 1425-1431.
- Thom M., Maretzki A., 1985. Evidence for a plasmalemma redox system in sugarcane. *Plant Physiology* 77: 873-876.
- Tonnejck A.E.G., 1983. Foliar injury responses of 24 bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) to various concentrations of ozone. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 99-104.
- Tuomainen J., Pellinen R., Roy S., Kuisinen M., Eloranta T., Karjalainen R., Kangasjaervi J., 1996. Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *Journal of Plant Physiology* 148: 179-188.
- Unsworth M.H., 1982. Exposure to gaseous pollutants and uptake by plants. In: Unsworth M.H., Ormrod D.P. (eds). Effects of gaseous air pollutants in agriculture and horticulture, pp. 43-63. Butterworths, London, UK.
- Werner W., Grey H.-G., Wielinger H., 1970. Über die Eigenschaften eines neues Chromogens fuer die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD Methode. *Zeitung Analytische Chemie* 252: 224-228.
- Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Langerbartels C., Sandermann H. Jr, 1994. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology* 106: 1007-1014.
- Winston G.W., 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells. Production and defences. In: Alscher R.G., Cummings J.R. (eds). Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms, pp. 57-86. Wiley-Liss, New York, NY, USA.

Received 16 April 1997

Accepted 10 July 1997

ASI
 SOCIÉTÉ SENÉGALITAINE D'ETHANOL
 DIAWARA

Prof Ibrahima DIAWARA
 Directeur Général de
 l'Éducation Nationale
 Président de l'Amicale
 Sénégal-Italienne (ASI)
 Case 11 x 8 Médina Dakar
 DIAWARA

