

L'ozone et les conifères du Sud-Est de la France

par Laurence DALSTEIN, Pierre VOLLENWEIDER,
Nicolas VAS et Madeleine Silvia GUNTARDT-GOERG

Plusieurs articles ont déjà été publiés dans notre revue sur les dégâts occasionnés par l'ozone sur les conifères. La mise en évidence du "stress" ozone a toujours présenté des difficultés. Dans cet article, les résultats de la microscopie apportent un élément nouveau dans la démonstration.

I. Introduction

Depuis plusieurs années, dans les Alpes-Maritimes, de graves atteintes foliaires dans différentes espèces de conifères s'observent parallèlement à de fortes concentrations d'ozone (DALSTEIN *et al.*, 2002, 2001, 1996). Les pins cembro (*Pinus cembra* L.), les pins sylvestres (*Pinus sylvestris* L.) et les pins d'Alep ou pins blancs (*Pinus halepensis* Mill.), du littoral niçois au massif du Mercantour, présentent très fréquemment, en effet, des symptômes de jaunissement, de chlorose et de défoliation précoce. Une étude centrée sur le pin cembro a montré que la chute prématurée des aiguilles âgées n'avait pas de causes évidentes, ni biotique (telle qu'une attaque parasitaire d'insectes ou de champignons), ni abiotique (telle que des déficiences dans l'alimentation minérale) (DALSTEIN, 1997). Dans des cas similaires de dépérissement affectant différentes espèces de conifères du Sud-Est de la France, non seulement les variations climatiques ou les problèmes stationnels (SOLICHON, 1993 ; TRANQUILLINI, 1979, 1976, 1969 ; BARBERO, 1972 ; FOURCHY, 1968) mais encore la pollution atmosphérique (DALSTEIN et DUPOUEY, 1999 ; DALSTEIN, 1999) semblent pouvoir jouer un rôle. D'importantes concentrations en ozone sont relevées chaque année depuis le commencement des mesures en 1994 (DALSTEIN *et al.*, 2001), et dépassent largement la valeur critique admise pour les arbres (Average Over the Threshold 40 : AOT40 = 10 ppm·h ; cette limite fixe le seuil au dessus duquel une perte de biomasse supérieure à 10% est à craindre). Des études sur les flux d'ozone dans les aiguilles d'épicéa (*Picea abies* (L.) Karsten) et de pin cembro (WIESER *et al.*, 2000) ont montré que les aiguilles dans la couronne de lumière, les jeunes aiguilles et les arbres dans les dépressions absorbaient davantage d'ozone que les aiguilles dans la couronne d'ombre ou que les aiguilles âgées et les arbres situés sur les crêtes. L'induction par l'ozone de symptômes visuels chez le pin d'Alep (SANZ *et al.*, 2000) a été confirmée avec des fumigations expérimentales. Cependant, les pertes d'aiguilles

observées jusqu'à présent ne sont pas à elles seules indicatrices d'une cause spécifique et ne sont pas, a priori, attribuables à l'ozone. Elles représentent, en effet, un stade terminal associé à de multiples pathologies et à une nécrose presque généralisée des tissus dans les organes foliaires. En conséquence, le rôle déstabilisateur que pourrait jouer l'ozone sur l'état sanitaire des conifères, dans le Sud-Est de la France, reste toujours incertain.

Il n'est pas possible de mesurer l'ozone dans les tissus foliaires car ce polluant se dégrade très rapidement après avoir pénétré dans les feuilles ou dans les aiguilles (PELLINEN *et al.*, 1999). En revanche, certains effets permettent de remonter à la cause : l'ozone induit des réactions en chaîne qui se traduisent par de multiples altérations de la structure microscopique des cellules et des tissus (GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 2000 ; GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 1997 ; GÜNTHARDT-GOERG, 1996 ; SUTINEN *et al.*, 1990). Les marqueurs microscopiques de ces changements permettent alors non seulement de certifier le rôle éventuel de l'ozone dans les aiguilles de l'année, ou dans les aiguilles vertes des années précédentes, mais encore de le différencier de celui des autres agents de stress. Ils indiquent aussi quels sont les processus physiologiques qui sont à l'origine des symptômes visibles (VOLLENWEIDER *et al.*, 2002). Les changements de la structure anatomique des feuilles ou des aiguilles de plusieurs espèces ont déjà fait l'objet de descriptions (GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 2000 ; GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 1997 ; ANTONEN *et al.*, 1996 ; GÜNTHARDT-GOERG, 1996 ; HOLOPAINEN *et al.*, 1996 ; MIKKELSEN et HEIDE-JORGENSEN, 1996 ; GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 1993 ; SUTINEN *et al.*, 1990). Les symptômes visuels d'ozone chez les conifères sont décrits sous le nom de "mottling" et ressemblent à des marbrures aux contours diffus de couleur vert clair ou jaune vert (pour des exemples, voir sous <http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>) dans la partie des aiguilles la mieux exposée à la lumière (LANGEBARTELS *et al.*, 1997 ; MCLEOD *et al.*, 1992 ; LANDOLT et LÜTHY-KRAUSE, 1991). Le symptôme microscopique le plus évident à l'origine du *mottling* est une dégradation ponctuelle de la chlorophylle (le pigment vert permettant la photosynthèse) dans les couches externes du mésophylle (le tissu chlorophyllien assimilateur). Une analyse plus poussée montre que, dans les cellules, la structure des chloroplastes est modifiée de façon caractéristique et que la

production d'amidon est altérée (HOLOPAINEN *et al.* 1996 ; SUTINEN *et al.*, 1990). À notre connaissance, il n'existe pas d'analyse microscopique des dommages d'ozone chez le pin cembro contrairement aux autres espèces concernées par cette étude, notamment, le pin sylvestre ou l'épicéa, dont les réactions en présence d'ozone sont mieux connues (SUTINEN *et al.* 1998 ; SUTINEN *et al.* 1990).

Dans cette étude, différentes approches ont été combinées pour mieux cerner la contribution de l'ozone à la dégradation de l'état sanitaire des conifères dans les Alpes-Maritimes. Les concentrations d'ozone ont été mesurées au moyen d'un analyseur physico-chimique localisé à l'Adréchas, à 70 km au Nord de Nice, et de capteurs passifs disposés dans un réseau de placettes arborées (DALSTEIN *et al.*, 2001). L'état sanitaire des conifères a été relevé lors de l'inventaire des défoliations et des jaunissements effectué en juillet 2000. Des aiguilles vertes de pins cembro ont fait l'objet d'examen macro- et microscopiques pour confirmer la présence de symptômes spécifiques d'ozone.

II. Matériel et méthodes

1. Mesure de l'ozone

Une campagne de mesure de 5 mois, de mai à septembre 2000, nous a permis de quantifier les niveaux d'ozone sur les pistes de l'Adréchas dans le massif du Mercantour au moyen d'un analyseur physico-chimique O3 41M, Environnement SA (Directive 92/72 CEE du conseil des communautés économiques européennes du 21.09.92). Le site de mesure était situé dans la clairière d'une forêt de pins sylvestre, à une altitude d'environ 1500 m et à 70 km au Nord de Nice (Cf. Fig. 1). Un réseau de 27 capteurs passifs d'ozone couvrant une surface de 2150 km² dans les départements des Alpes-Maritimes et des Alpes-de-Haute-Provence ont fourni des moyennes mensuelles pour la même période d'observation (Cf. Fig. 1). Les capsules à diffusion passive (DALSTEIN *et al.*, 2001) étaient placées hors forêt à environ 1,2 m au dessus du sol. Deux capteurs étaient situés dans les zones de prélèvement pour l'analyse microstructurale : un se trouvait dans le vallon (1610 m), et l'autre au col de Salèse (2080 m) (Mercantour, Cf. Fig. 1). L'analyse des résultats s'est faite dans le laboratoire IVL de Göteborg en Suède.

2. Mesure de l'endommagement foliaire

Les dommages foliaires ont été observés au mois de juillet 2000 dans 36 placettes établies dans des territoires représentatifs du littoral niçois, du moyen et haut pays, notamment dans le Parc national du Mercantour. Chaque placette de 20 arbres a une surface d'au moins 0,5 hectare et fait l'objet d'un suivi à long terme depuis 1995. 17 placettes sur un total de 36 (47,2 %) sont équipées ou sont localisées à proximité (1 km au maximum) d'un capteur passif d'ozone. Trois essences différentes ont été sélectionnées, le pin d'Alep (sur le littoral), le pin sylvestre (dans le moyen pays) et le pin cembro (dans le haut pays), en raison de leur sensibilité à l'ozone (Ac.Sc, 1993 ; voir aussi sous <http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>). L'épicéa et le mélèze (*Larix decidua* Mill.) ont fait l'objet de notations dans les sites d'altitude où le pin cembro était faiblement représenté. Les notations de décoloration et de défoliation ont suivi le protocole européen d'observation utilisé sur les placettes de niveau I (ULRICH et LANIER, 1996). Selon cette méthode, le stade d'avertissement est atteint pour une défoliation comprise entre 10 et 25 % et l'endommagement des arbres est réel pour une classe de décoloration > 2 (0 = arbre vert ; 4 = arbre fortement jaunissant), et pour un pourcentage de perte foliaire supérieur à 25 %.

3. Détection et validation des symptômes induits par l'ozone

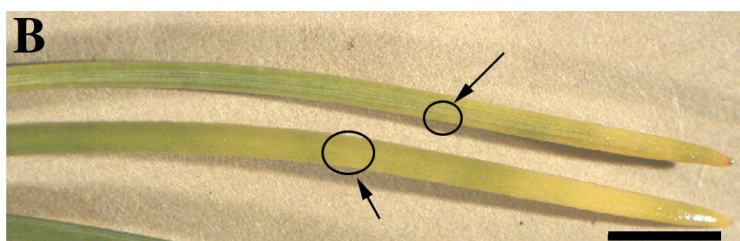
Les symptômes visibles d'ozone ont été expertisés dans des aiguilles de pin cembro âgées de 1 (n), 2 (n-1) et 3 (n-2) saisons de végétation. Les échantillons ont été prélevés à 2040 m d'altitude au col de Salèse (aiguilles symptomatiques, arbres dépérissants) et à 1700 m dans le vallon de Salèse



Fig. 1 (ci-dessus) : Localisation dans les Alpes-Maritimes en 2000 des stations de Qualitair, des capteurs passifs d'ozone et des placettes d'arbres.

(aiguilles et arbres asymptotiques) au mois d'octobre 2000. Les échantillons frais (conservés dans de l'eau) ou fixés (dans de la glutaraldéhyde, pH 7,2), ont fait l'objet d'examen microscopiques au WSL en Suisse après observation et caractérisation des symptômes visibles (Cf. Fig. 2). Les méthodes utilisées sont décrites dans VOLLENWEIDER *et al.* (2002). Les symptômes d'ozone ont été validés en observant la localisation et la morphologie des lésions, en référence aux observations sur du matériel soumis à fumigation en conditions contrôlées (GÜNTHARDT-GOERG *et al.*, 2000 ; GÜNTHARDT-GOERG, 1996) et en référence aux effets connus de l'ozone sur la physiologie des feuilles et des aiguilles (voir VOLLENWEIDER *et al.* 2002).

Fig. 2 (ci-dessous) : Symptômes visibles d'ozone chez le pin cembro (Parc national du Mercantour). **A** aiguilles asymptotiques à la fin de la première saison de végétation (n). **B** aiguilles symptomatiques après 3 saisons de végétation (n-2) ; les aiguilles sont jaunissantes (photobleaching) et présentent un mottling caractéristique. Barres : 1 cm.



III. Résultats et discussion

1. Ozone

Fig. 3 (ci-dessous) :
Moyennes mensuelles d'ozone (mai-septembre 2000) mesurées à l'aide de capteurs passifs en fonction de l'altitude. La situation topographique de chaque station est indiquée par différentes couleurs.

Pendant l'été 2000, les moyennes mensuelles d'ozone mesurées à la station de l'Adréchas ont systématiquement dépassé celles du littoral azuréen (communication Qualitair). Comme les années précédentes (DALSTEIN, 1997), les pics d'ozone dans le Mercantour ont toujours suivi avec un retard de 5 heures en moyenne, ceux enregistrés le même jour (généralement vers 12 h) dans

l'agglomération niçoise. Les masses d'air pollué sont en effet peu à peu repoussées vers le haut-pays par les faibles brises soufflant du sud-sud-ouest (communication personnelle de Météo France de Nice). En 2000, l'AOT 40 (somme des concentrations horaires supérieures à 40 ppb mesurées pendant 6 mois par ciel clair et avec une illumination supérieure à 50W/m²; dans notre cas l'AOT 40 a été calculé après 5 mois de mesure seulement) atteignait une valeur de 29,8 ppm·h et surpassait de près de 20 ppm·h la norme européenne. La SUMA (somme des concentrations horaires), quant à elle, totalisait 176.9 ppm·h. Les moyennes mensuelles d'ozone entre mai et septembre 2000 variaient en fonction de la situation topographique des capteurs passifs (Cf. Fig. 3). Les valeurs mesurées dans les zones de crêtes du moyen et du haut pays étaient en moyenne de 51 ± 0,86 ppb (min = 45 ppb ; max = 56 ppb) et surpassaient de 21,5 % celles mesurées dans les fonds de vallée (40 ± 2,43 ppb ; min = 30 ppb ; max = 47 ppb). Les inversions de température, la nuit, confinent en effet les polluants primaires (NOx et COv) sur le littoral et au fond des vallées, annulant ainsi leur effet réducteur sur l'ozone en altitude (DALSTEIN *et al.*, 2001). L'ozone reste alors stable et s'accumule dans un air contenant peu d'aérosols. L'augmentation des concentrations d'ozone en fonction de l'altitude est aussi observée dans d'autres études (HILDEBRAND *et al.* 1996). Au fond du vallon de Salèse, la moyenne mensuelle d'ozone pendant la saison de végétation 2000 était de 30 ppb et au col de 56 ppb. Ces valeurs compte tenu d'un AOT 40 pour 6 mois très probablement supérieur à 30 ppm·h sont certainement suffisantes pour induire des symptômes visibles d'ozone sachant que l'épicéa qui est moins sensible que les pins peut développer les premiers symptômes visibles (photobleaching) pour un AOT 40 = 34 ppm·h (<http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>).

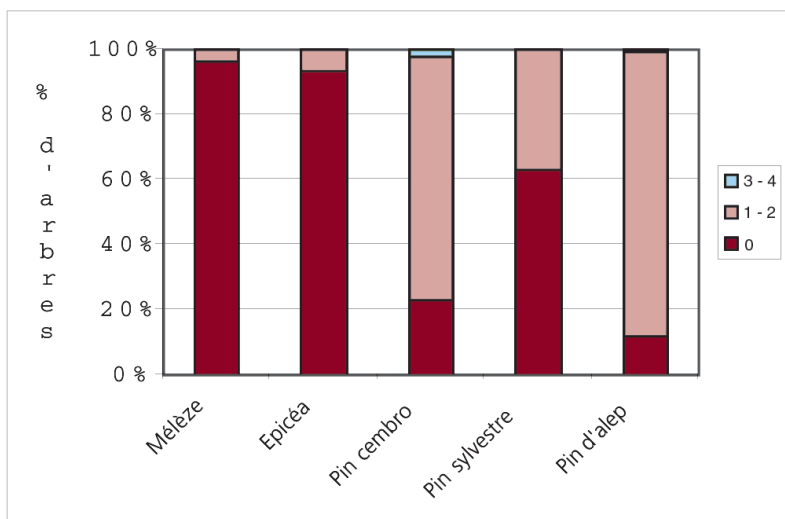
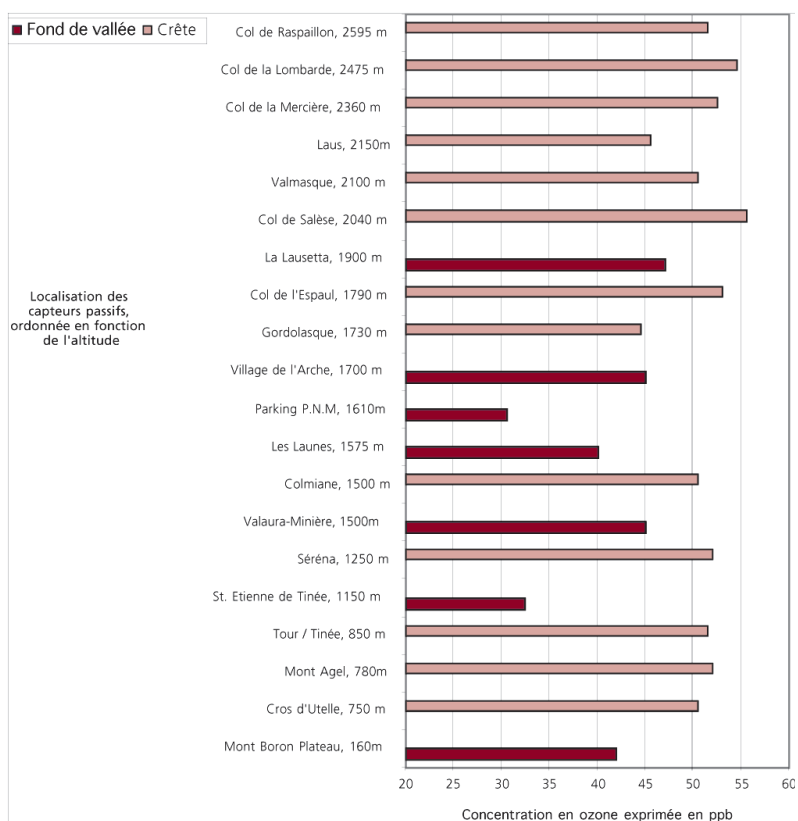


Fig. 4 (ci-contre) :
Niveaux de décoloration des 5 espèces de conifères analysées :
pin cembro : N = 294
mélèze : N = 172
épicéa : N = 56
pin sylvestre : N = 78
pin d'Alep : N = 120

2. Endommagement foliaire

Décoloration

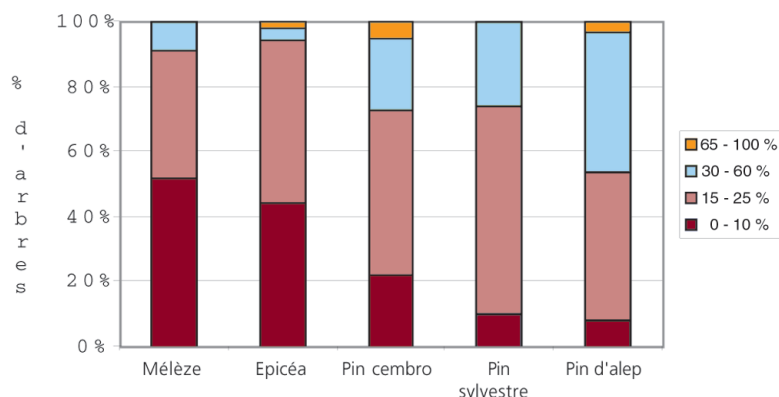
Les symptômes typiques d'ozone (*mottling*) n'ont pas fait l'objet d'examens systématiques dans les placettes analysées. S'ils apparaissent, c'est en tous cas avant que les aiguilles âgées de plusieurs années ne se mettent à jaunir. La figure 4 récapitule pour les cinq essences étudiées l'intensité des décolorations sur l'ensemble des arbres notés. Parmi les essences d'altitude, le mélèze et l'épicéa avaient rarement une couronne jaunissante. Les pins étaient plus touchés, notamment le pin cembro avec 2 % des individus très décolorés (classes 3 et 4) et avec 75 % des individus dans les classes 1-2. Le pin d'Alep sur le littoral niçois était encore plus atteint avec 90 % des arbres dans les classes 1-2.

Défoliation

La figure 5 récapitule, pour les cinq espèces de conifères, les pourcentages de défoliation sur l'ensemble des arbres notés. Parmi les essences d'altitude, le mélèze et l'épicéa étaient aussi bien les moins défoliés que les moins décolorés alors que les pins cembro et les pins sylvestre ne comptaient plus qu'une minorité d'arbres sans pertes d'aiguilles. Les pins cembro étaient, comparativement, davantage défoliés que les sylvestres (classes 65-100%). Sur le littoral niçois, le pourcentage de pins d'Alep sans pertes d'aiguilles était très faible et la majorité des arbres se répartissait dans les catégories de défoliation de 15 à 60%. La décoloration et la défoliation indiquaient donc des tendances similaires. Les différences interspécifiques étaient évidentes : les pins étant en effet les plus atteints de tous les conifères. A part la sensibilité connue des pins à l'ozone et l'insensibilité relative de l'épicéa (<http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>), la comparaison interspécifique ne contredit, ni ne confirme un rôle causal éventuel de l'ozone.

3. Détection et validation des symptômes d'ozone dans les aiguilles de pin cembro

Les aiguilles de pins cembro prélevées au col de Salèse présentaient un *mottling* typique dès la génération n-1. Un deuxième



symptôme sous la forme d'un jaunissement de la face exposée à la lumière (*photobleaching*) était aussi visible, y compris dans les aiguilles de l'année. Ce symptôme visible peut être induit par l'ozone, d'après notre expérience.

Durant les examens microscopiques, aucun champignon et aucune prolifération bactérienne n'ont été détectés dans les tissus observés, à proximité ou non des lésions. Ce résultat exclut qu'un pathogène, ayant échappé en première analyse à l'examen visuel, soit à l'origine des symptômes macroscopiques. Des différences claires ont été observées au niveau microscopique entre la structure du mésophylle des aiguilles asymptomatiques (témoin) et symptomatiques. Ce tissu responsable de la couleur verte de l'aiguille constitue le tissu-cible habituel de l'ozone (PELLINEN *et al.*, 1999 ; PELL *et al.*, 1997). La vitalité des autres tissus composant l'aiguille était normale (sur la base de l'examen en microscopie photonique) et ne présentait pas de différences remarquables entre les échantillons analysés. Dans le mésophylle, seuls les marqueurs de vitalité étaient clairement différents entre les deux types d'aiguilles pourtant récoltées dans deux stations distinctes. Les aiguilles du valon de Salèse ont donc fourni des témoins apparemment suffisants pour celles prélevées au col.

Les changements dans la structure des aiguilles de pins cembro sont illustrés dans les figures 6 à 9 et résumés dans le tableau I. Dans les aiguilles avec un *photobleaching*, la chlorophylle était partiellement dégradée, particulièrement dans les couches externes du mésophylle (Cf. Fig. 6B, 6D) en relation avec une probable perturbation de la struc-

Fig. 5 (ci-dessus) :

Niveaux de défoliation de 5 espèces de conifères analysées : pin cembro : N = 294 ; mélèze : N = 172 ; épicéa : N = 56 ; pin sylvestre : N = 78 ; pin d'Alep : N = 120.

Tab. I (ci-contre) :
Résumé des altérations
de structure observées
dans le mésophylle
des aiguilles
symptomatiques
de pins cembro.

Structure	Figures	photobleaching	photobleaching et mottling
chlorophylle	6,7	altérée	altérée
proanthocyanidines (oligomères)	9	augmentation	diminution
proanthocyanidines (polymères)	9	augmentation ?	diminution
polyphénols vacuolaires	7B	augmentation	augmentation
cytoplasme	8	condensation	forte condensation
noyau et chromatine	8	condensation	forte condensation
vacuome	6, 8	augmenté	fortement augmenté
nécroses ponctuelles	7B	absentes	présentes

Fig. 6 (ci-dessous) :

Altération de la chlorophylle (photobleaching) dans le mésophylle. Le photobleaching augmente particulièrement dans les couches externes et selon la progression : A (contrôle n) < C (contrôle n - 2) < B (symptomatique n) < D (symptomatique n - 2). Barres : 100 µm.

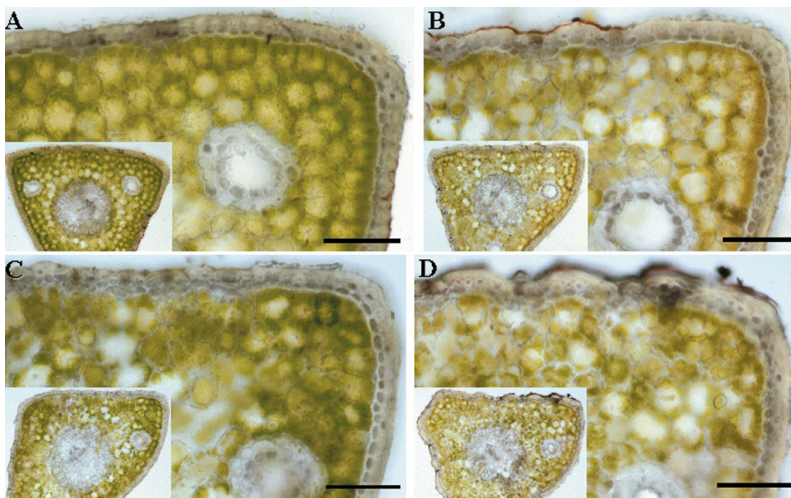


Fig. 7 (ci-dessous) :

Structure d'un symptôme de type *mottling* en microscopie à fluorescence (UV). Les cellules du mésophylle dans la partie centrale du symptôme sont nécrosées (n) alors que les cellules environnantes accumulent des polyphénols (fluorescence bleue) dans les parois (flèches) et dans les vacuoles (P). La fluorescence de la chlorophylle (en rouge) est altérée. A contrôle (n). B symptomatique (n-2). Barres : 25 µm.

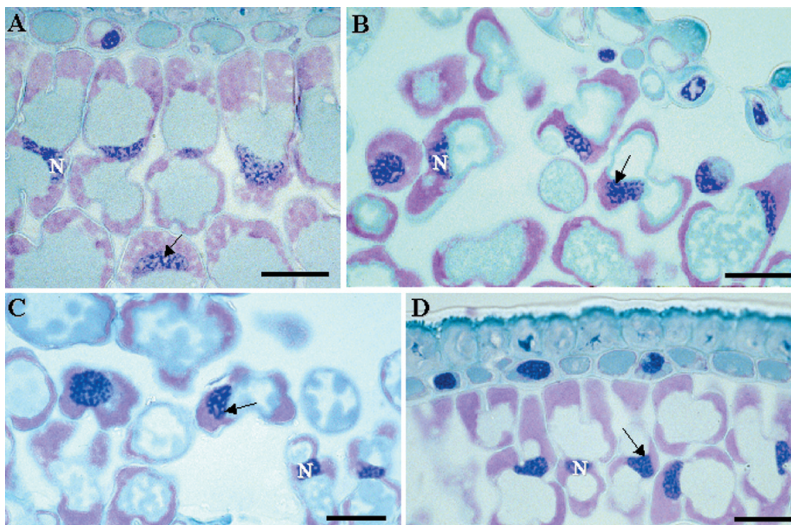
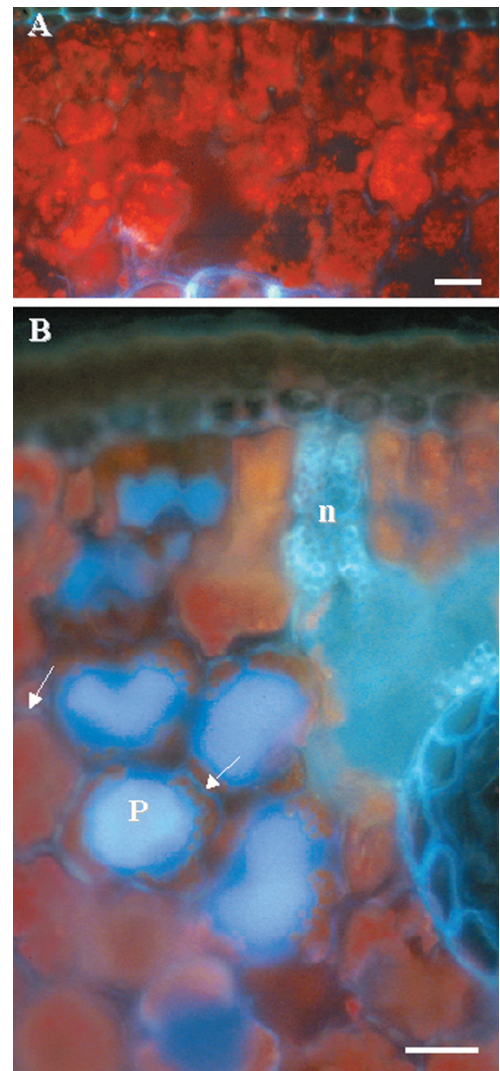
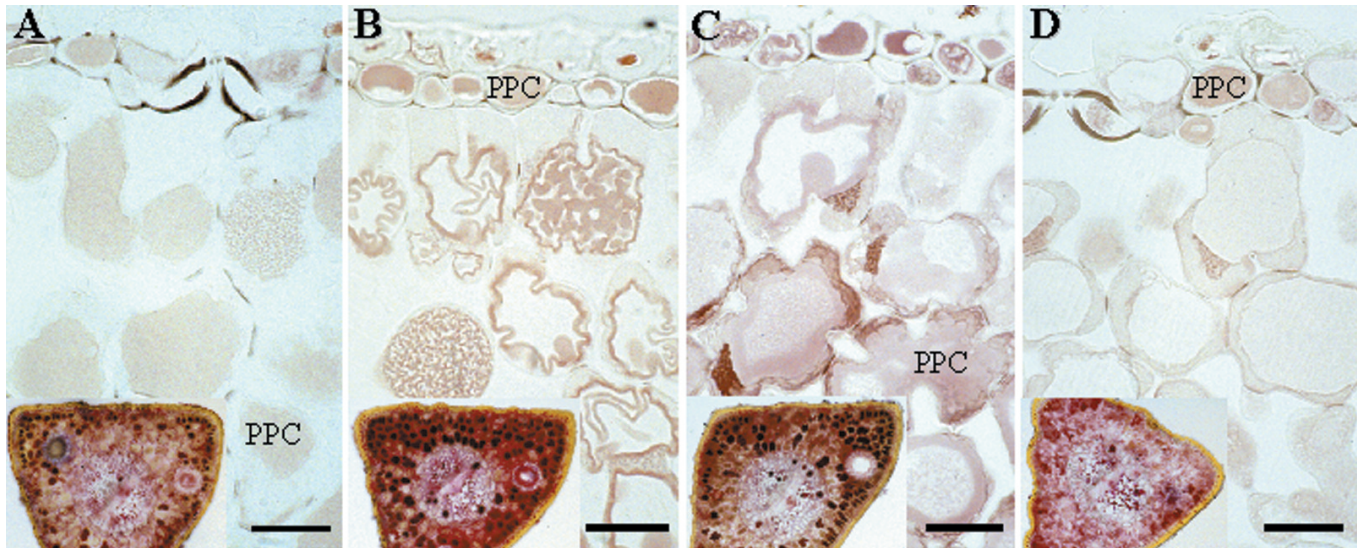


Fig. 8 (ci-dessus) :

Augmentation de la condensation du cytoplasme (en rose), du noyau (N) et de la chromatine (flèches) dans les cellules non-nécrosées du mésophylle des aiguilles symptomatiques selon la progression : A (contrôle n) < B (symptomatique n) < C (contrôle n - 2) < D (symptomatique n - 2). Barres : 25 µm.



ture et de l'activité physiologique des chloroplastes. L'ozone peut en effet induire une altération de la structure des grana¹ et des thylacoïdes² (PÄÄKKÖNEN *et al.*, 1995; SUTINEN *et al.* 1990), une augmentation du stress oxydant dans les chloroplastes (PELL *et al.*, 1997) et une diminution de la photosynthèse (PELL *et al.*, 1999). Cette dégradation de l'appareil chloroplastique et des fonctions photosynthétiques est indicatrice de phénomènes de sénescence accélérée (SA) (FUKUDA, 2000) qui peut être induit par l'ozone sans lui être spécifique (d'autres facteurs de stress pris isolément ou agissant de façon conjointe peuvent aussi induire des SA similaires). Dans les aiguilles plus âgées (symptomatiques n-2), avec une exposition plus prolongée à l'ozone, des nécroses ponctuelles discrètes (Cf. Fig. 7B) étaient localisées au niveau des *mottling*. Différents marqueurs cytologiques tels que l'induction de polyphénols pariétaux (Cf. Fig. 7B) ou la compaction des restes cellulaires (résultat non présenté) indiquaient une réponse cellulaire de type "réponse hypersensible" (HR-like) dans les cellules nécrotiques. Cette dernière est non seulement inductible par des pathogènes (champignons ou bactéries), mais encore par l'ozone (RAO *et al.*, 2000 ; SANDERMANN *et al.*, 1998), sans être spécifique de ce stress quoique rarement observée avec d'autres stress abiotiques. En dehors des zones nécrosées, les cellules du mésophylle montraient des signes de vitalité déclinante avec par exemple une vacuole de grande taille remplie de polyphénols fluores-

cents sous illumination UV (Cf. Fig. 7B) ou une condensation croissante du cytoplasme et du noyau (Cf. Fig. 8B, 8D) en fonction de l'âge de l'aiguille et de l'intensité des dégâts. De même que pour la chlorophylle, ces marqueurs étaient aussi indicatifs de SA. Ils apparaissaient déjà dans les témoins n-2, mais avec une intensité moindre que dans les aiguilles symptomatiques. Des contraintes environnementales excessives peuvent également contribuer à l'expression de symptômes de SA. Compte-tenu que les aiguilles symptomatiques et asymptomatiques provenaient de deux stations voisines mais distinctes, l'ozone n'est peut-être pas le seul facteur de stress influençant négativement la vitalité des aiguilles symptomatiques de pins cembro prélevées dans la région du col de Salèse.

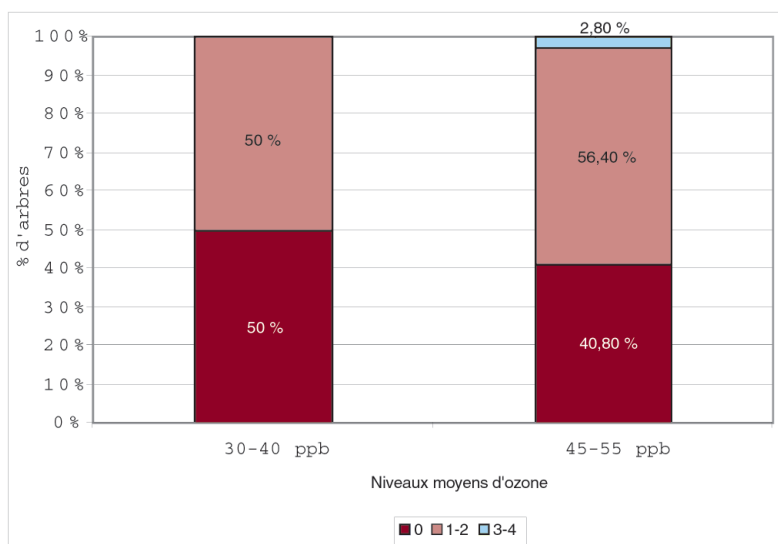
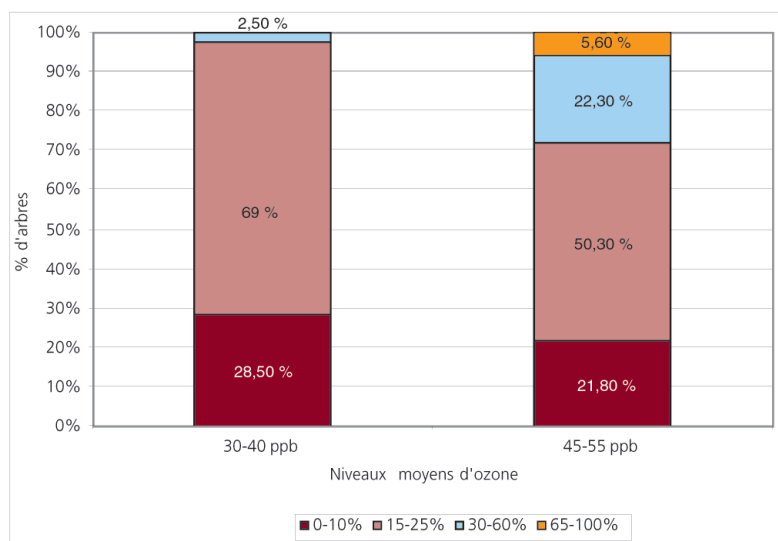
Précisant encore le diagnostic, nous avons observé des variations dans le contenu en proanthocyanidines (un des principaux tanins chez les arbres). Or, ces substances du métabolisme secondaire jouent différents rôles importants, soit en tant que petites molécules formées de quelques sous-unités nommées oligoproanthocyanidines (OPC) ou en tant que polymères macro-moléculaires (proanthocyanidines polymérisées ou PPC). Les OPC sont plus réactifs que les PPC et ont, entre autre, des fonctions antioxydantes ; les PPC ont des propriétés tannantes utiles aux plantes pour leur défense contre les herbivores (SEIGLER, 1998). Ces substances sont sensibles à l'oxydation (AMIOT *et al.*, 1992), inductibles par

Fig. 9 (ci-dessus) : Modifications quantitatives et qualitatives des polymères (PPC) et des oligomères (taches rouges sombres dans les encarts) de proanthocyanidines vacuolaires. A contrôle (n). B symptomatique (n). C contrôle (n-2). D symptomatique (n-2). Barres: 25 µm.

1 et 2 - Les thylacoïdes sont des membranes en forme de sac aplatis plus ou moins empilés les uns sur les autres. Un amas de thylacoïdes forme un granum (plur. grana). Les thylacoïdes se trouvent dans les chloroplastes et contiennent les pigments (dont la chlorophylle) et une partie de la "machinerie biochimique" utilisée par la plante pour la photosynthèse. Les pigments chlorophylliens sont aussi responsables de la couleur de l'aiguille.

l'ozone (SANDERMANN, 1996) et font partie à notre sens des indicateurs des changements du potentiel redox cellulaire (voir VOLLENWEIDER *et al.* 2002), lequel est modifié par l'ozone (SCHRAUDNER *et al.*, 1997). Dans les aiguilles symptomatiques, la quantité de tannins était en augmentation dans les aiguilles de l'année et en diminution dans les aiguilles n-2 par rapport aux aiguilles asymptomatiques. Les PPC étaient aussi le seul marqueur cellulaire, à part la chlorophylle, montrant une asymétrie dans la structure des tannins entre les couches internes et externes du mésophylle, une indi-

Fig. 10 (ci-dessous) :
Distribution des classes de défoliation chez les pins cembro du Mercantour pour deux concentrations moyennes mensuelles d'ozone (mai-septembre 2000) : 30-40 ppb et 45-55 ppb, (N = 234).



cation de l'interaction observée dans d'autres espèces entre stress oxydant et exposition à la lumière (VOLLENWEIDER *et al.* 2002). On retiendra de ces résultats, pour l'instant préliminaires, que les proanthocyanidines étaient altérées dans le matériel symptomatique suivant des gradients qui restent à confirmer.

L'ozone représente, en définitive, une cause vraisemblable des altérations détectées dans les aiguilles n à n-2. Les symptômes macroscopiques et microscopiques sont typiques en effet d'un stress oxydant d'origine abiotique. L'absence d'altérations dans le cylindre central indique qu'il ne s'agit pas d'un stress d'origine racinaire et la présence simultanée de réponses de type HR-like et SA dans le mésophylle est une bonne bio-indication de l'implication de l'ozone. Cette validation des symptômes visuels, outre qu'elle nécessite une confirmation, se limite cependant pour l'instant aux générations n à n-2 et donc aux aiguilles apparaissant "vertes" vues de loin. Pour les aiguilles jaunissantes, ou dans les cas de défoliation, il n'est pas possible sur la base de ces analyses d'incriminer directement l'ozone, même s'il joue probablement un rôle. En effet, l'accélération de la sénescence des tissus indiquée par plusieurs marqueurs microscopiques implique une décoloration et une abscission prématurée des aiguilles au cours des saisons de végétation suivantes. Pour préciser l'importance du stress oxydant, il faudrait encore compléter les observations effectuées en ayant recours à un échantillonnage plus systématique, analyser quantitativement certains marqueurs et effectuer des expositions expérimentales à l'ozone pour certifier les altérations structurales observées.

Fig. 11 (ci-contre) :
Distribution des classes de décoloration chez les pins cembro du Mercantour pour deux concentrations moyennes mensuelles d'ozone (mai-septembre 2000) : 30-40 ppb et 45-55 ppb, (N = 234).

4. Contribution de l'ozone à l'endommagement foliaire

La contribution précise de l'ozone à l'endommagement foliaire observé est difficile à estimer car :

1 - La défoliation et le jaunissement ne sont pas attribuables à une cause spécifique et ne constituent en tous cas pas des symptômes visibles d'ozone.

2 - Les changements climatiques récents occasionnent probablement un stress hydrique en début de saison, qui peut contribuer au mauvais état sanitaire des pins cembro. Depuis 1983, en effet, bien que le bilan annuel reste inchangé, les précipitations se sont décalées dans le temps : les précipitations hivernales se sont raréfiées et l'enneigement en altitude a diminué alors que les chutes de neige au printemps et les précipitations torrentielles en automne ont augmenté (DALSTEIN, 1997). En conséquence, il est probable que les réserves en eau disponibles dans le sol pour les arbres, particulièrement en début de saison de végétation, ont diminué. Un endommagement foliaire et une perturbation du régime hydrique de pins croissant dans des stations sèches, suite à l'altération actuelle du climat, s'observe aussi dans d'autres régions alpines, par exemple dans le cas de certains peuplements de pins sylvestre du Valais central en Suisse (voir sous <http://www.wsl.ch/programme/walddynamik/wdoffen-fr.ehtml>).

3 - La recherche actuelle sait repérer et confirmer les symptômes spécifiques d'ozone mais ignore quelle est l'étendue du rôle déstabilisateur de ce polluant, particulièrement à long terme et chez les arbres âgés.

Cependant, plusieurs résultats de cette étude suggèrent une responsabilité au moins partielle de l'ozone concernant la dégradation de l'état sanitaire du pin cembro.

1.- Des concentrations très élevées d'ozone sont mesurées dans les Alpes-Maritimes. Les niveaux actuels sont suffisants pour induire des symptômes visibles dans de nombreuses espèces (voir sous <http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>) et surpassent à tel point les valeurs limites qu'un effet déstabilisateur sur des essences forestières déjà affaiblies par les sécheresses hivernales à répétition est probable. Les précurseurs proviennent du littoral et sont exportés par les courants dominants vers l'arrière pays avec l'ozone produit sur place.

2.- Les figures 10 et 11 indiquent que la proportion de pins cembro décolorés et défoliés en 2000 dans 17 stations équipées de capteurs passifs d'ozone augmentait dans les sites davantage pollués. En effet, les arbres les plus défoliés étaient situés préférentiellement sur les crêtes où des niveaux supérieurs d'ozone ont été mesurés. Même si les arbres sur les crêtes absorbent moins d'ozone (WIESER *et al.*, 2000), il y a de fortes chances que les forts taux qui sont mesurés dans la région du Parc national du Mercantour et qui perdurent pendant de longs mois (données Qualitair, station Adréchas), s'additionnent à d'autres stress stationnels pour augmenter l'endommagement foliaire.

3.- Des symptômes spécifiques d'ozone ont été repérés et confirmés dans de jeunes aiguilles de pin cembro. Nous soupçonnons que d'autres essences sensibles tel que le pin d'Alep (SANZ *et al.*, 2000) présentent aussi de tels symptômes dans la région niçoise. L'accélération de la sénescence dans le méso-phylle des aiguilles symptomatiques contribue sans le moindre doute à un jaunissement et à une abscission prématurés.

Conclusion

En résumé, les résultats obtenus consolident la présomption que l'ozone est au minimum un cofacteur de déstabilisation important de l'état sanitaire des pins cembro croissant en altitude dans l'arrière pays des Alpes-Maritimes. Ces résultats nécessitent des confirmations, notamment en ce qui concerne l'étendue des symptômes spécifiques d'ozone dans différentes espèces de conifères et la dose approximative provoquant l'apparition d'un *mottling*. Les autres pins devraient également faire l'objet d'analyses microscopiques pour confirmer un impact spécifique de l'ozone. Enfin les incertitudes concernant l'importance relative de l'ozone et des modifications climatiques en tant que facteurs responsables de l'endommagement foliaire justifient la poursuite des recherches.

**L.D., P.V.,
N.V., M.S.G.G.**

Laurence DALSTEIN
Nicolas VAS
Groupe International
d'Etudes des Forêts
Subalpines (GIEFS),
69 avenue des
Hespérides - 06300
Nice, France.

Pierre
VOLLENWEIDER
Madeleine Silvia
GUNTARDT-GOERG
Institut fédéral de
recherches WSL,
Zürcherstrasse 111,
CH-8903
Birmensdorf/ZH,
Suisse.

Remerciements

Sont remerciés le réseau Qualitair de Nice, le Parc national du Mercantour et Michaël Ottiger, stagiaire au WSL, pour l'aide technique apportée à l'élaboration de ce travail.

Bibliographie

- ACADEMIE DES SCIENCES (1993) - Ozone et propriétés oxydantes de la troposphère. Lavoisier Ed. 30, 249p.
- AMIOT M.J., TACCHINI M., AUBERT S., NICOLAS J., (1992) - Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science* 57, pp 958-962.
- ANTTONEN S., SUTINEN M.L., HEAGLE A.S., (1996) - Ultrastructure and some plasma membrane characteristics of ozone-exposed loblolly pine needles. *Physiologia Plantarum* 98, pp 309-319.
- BARBERO M., (1972) - Etudes phytosociologiques et écologiques comparées des végétations alpine, subalpine et mésogéenne des Alpes Maritimes et Ligures. Thèse Univ. Provence Marseille. Otto Koeltz Antiquariat, Krenigstein, 418 p.
- DALSTEIN L., (1997) - Etat physiologique des cembraies du Mercantour et du Queyras en liaison avec la pollution atmosphérique et les facteurs écologiques. Thèse de 3ème cycle, Université Aix-Marseille, 229 p.
- DALSTEIN L., (1999) - La méthode d'inventaire des dommages forestiers appliquée à l'étude de la Cembraie du Vallon de Mollières, Parc National du Mercantour. *For. Med* XX, n°3, pp115-119.
- DALSTEIN L., DUPOUEY J-L., (1999) - Dendroécologie et état sanitaire de l'Arolle dans le Mercantour. *For. Med* XX, n°4, pp 219-224.
- DALSTEIN L., TETON S., COTTEREAU C., VAS N., (2001) - Niveaux d'ozone et endommagement foliaire sur quelques essences méditerranéennes. *Pollution Atmosphérique* 170, pp 263-277.
- FOURCHY P., (1968) - Notes sur le Pin cembro dans les Alpes françaises. *Rev. for. fr.* 2, pp 77-94.
- FUKUDA H., (2000) - Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44, pp 245-253.
- GÜNTHARDT-GOERG M.S., (1996) - Different Responses to Ozone of Tobacco, Poplar, Birch, and Alder. *Journal of Plant Physiology* 148, pp 207-214.
- GÜNTHARDT-GOERG M.S., MCQUATTIE C.J., MAURER S., FREY B., (2000) - Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environmental Pollution* 109, pp 489-500.
- GÜNTHARDT-GOERG M.S., MCQUATTIE C.J., SCHEIDEGGER C., RHINER C., MATYSSEK R., (1997) - Ozone-Induced Cytochemical and Ultrastructural Changes in Leaf Mesophyll Cell Walls. *Canadian Journal of Forest Research-Journal Canadien de la Recherche Forestiere* 27, pp 453-463.
- GÜNTHARDT-GOERG M.S., MATYSSEK R., SCHEIDEGGER C., KELLER T., (1993) - Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees Structure and Function* 7, pp 104-114.
- HILDEBRAND E., SKELLY J.M., FREDERICKSEN T.S., (1996) - Foliar response of ozone sensitive hardwood tree species from 1991 to 1993 in the Shenandoah National Park, Virginia. *Canadian Journal of Forest Research-Journal Canadien de la Recherche Forestière* 26, pp 658-669.
- HOLOPAINEN T., ANTTONEN S., PALOMAKI V., KAINULAINEN P., HOLOPAINEN J.K., (1996) - Needle Ultrastructure and Starch Content In Scots Pine and Norway Spruce After Ozone Fumigation. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 74, pp 67-76.
- LANDOLT W., LÜTHY-KRAUSE B., (1991) - Wirkungen umweltrelevanter Ozon-Konzentrationen auf verschiedene Pflanzen. In: Stark (ed) *Luftschadstoffe und Wald – Lufthaushalt, Luftverschmutzung und Waldschäden in der Schweiz* Vol. 5. Verlag der Fachvereine Zürich, pp 127-134.
- LANGEBARTELS C., ERNST D., HELLER W., LÜTZ C., PAYER H.-D., SANDERMANN H.

- JR., (1997) - Ozone responses of trees : results from controlled chamber exposures at the GSF Phytotron. In Ecological Studies, Vol.127, Sandermann *et al.*, (eds) Forest decline and ozone. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 163-200.
- MCLEOD A.R., SHAW P.J.A., HOLLAND M.R., (1992) - The Liphook forest fumigation project: studies of sulfure dioxide and ozone effects on coniferous trees. For Ecol Manage 51, pp 121-127.
- MIKKELSEN T.N., HEIDE-JORGENSEN H.S., (1996) - Acceleration of leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. by low levels of tropospheric ozone demonstrated by leaf colour, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure. Trees-Structure & Function 10, pp 145-156.
- PÄÄKKÖNEN E., HOLOPAINEN T., KARENLAMPI L., (1995) - Aging-Related Anatomical and Ultrastructural-Changes in Leaves of Birch (*Betula-Pendula* Roth) Clones As Affected By Low Ozone Exposure. Annals of Botany 75, pp 285-294.
- PELL E.J., SCHLAGNHAUFER C.D., ARTECA R.N., (1997) - Ozone-Induced Oxidative Stress - Mechanisms of Action and Reaction. Physiologia Plantarum 100, pp 264-273.
- PELL E.J., SINN J.P., BRENDLEY B.W., SAMUELSON L., VINTEN JOHANSEN C., TIEN M., SKILLMAN J., (1999) - Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. Plant Cell And Environment 22, pp 779-790.
- PELLINEN R., PALVA T., KANGASJARVI J., (1999) - Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. Plant Journal 20, pp 349-356.
- RAO M.V., KOCH J.R., DAVIS K.R., (2000) - Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. Plant Molecular Biology 44, pp 345-358.
- SANDERMANN H., (1996) - Ozone and Plant Health. Annual Review of Phytopathology 34, pp 347-366.
- SANDERMANN H.J., ERNST D., HELLER W., LANGEBARTELS C., (1998) - Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends in plant science - reviews 3, pp 47-50.
- SANZ M.-J., CALATAYUD V., CALVO E., (2000) - Spatial pattern of ozone injury in Aleppo pine related to air pollution dynamics in coastal-mountain region of eastern Spain. Environmental Pollution 108, pp 239-247.
- SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H., (1997) - Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. Physiologia Plantarum 100, pp 274-280.
- SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., SANDERMANN JR. H., (1996) - Plant defence systems and ozone. Biochemical Society Transactions 24, 456-461.
- SEIGLER D.S., (1998) - Plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp 193-214.
- SOLICHON J.M., (1993) - Structuration et évolution des mélèzeins des Alpes-Maritimes à partir de méthodes diachroniques comparatives, régénération et dynamique spatiale. Thèse Univ. Droit, Economie et Science, dépt. écologie, pp 1-90.
- SUTINEN S., LUMME I., MÄENPÄÄ M., ARKHIPOV V., (1998) - Light microscopic structure of needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in relation to air pollution and needle element concentrations in S.E. Finland and the Karelian Isthmus, N.W. Russia. Trees Structure and Function 12, pp 104-114.
- SUTINEN S., SKÄRBY L., WALLIN G., SELLDEN G., (1990) - Long-Term Exposure of Norway Spruce, *Picea-Abies* (L) Karst, to Ozone in Open-Top Chambers. 2. Effects On the Ultrastructure of Needles. New Phytologist 115, pp 345-355.
- TRANQUILLINI W., (1969) - Photosynthese und Transpiration einiger Holzarten bei verschieden starkem Wind. Cbl. ges. Forstwesen 86, pp 35-48.
- TRANQUILLINI W., (1976) - Water Relations and Alpine Timberline. Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlin 19, pp 473-491.
- TRANQUILLINI W., (1979) - Physiological Ecology of the Alpine Timberline. Ecological studies, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 131p.
- ULRICH E., LANIER M., (1996) - RENECOFOR- Etat sanitaire des peuplements du réseau en 1994 et 1995. Editeur : Office National des Forêts, Département des Recherches Techniques, ISBN 2 - 84207 - 047 - X, 36p.
- VOLLENWEIDER P., OTTIGER M., GÜNTHARDT-GOERG M.S., (2002) - Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. Environmental Pollution (accepted).
- WIESER G., HÄSLER R., GÖTZ B., KOCH W., HAVRANEK W.M., (2000) - Role of climate, crown position, tree age and altitude in calculated ozone flux into needles of *Picea abies* and *Pinus cembra* : a synthesis. Environmental Pollution 109, pp 415-422.

Résumé

Dans le Sud-Est de la France des défoliations importantes chez plusieurs espèces de conifères s'observent parallèlement à de fortes concentrations d'ozone. Des recherches récentes permettent de discriminer les symptômes spécifiques d'ozone dans des feuilles ou des aiguilles par rapport aux altérations causées par d'autres facteurs de stress. Cette étude présente les niveaux d'ozone mesurés en 2000 sur le littoral et dans l'arrière-pays niçois et les compare aux taux de décoloration et de défoliation observés sur cinq espèces de conifères. Chez le pin cembro, des aiguilles ont été prélevées pour détecter et vérifier la présence de symptômes spécifiques d'ozone. Les niveaux d'ozone mesurés étaient suffisants pour causer des symptômes visibles et, probablement, pour affecter la croissance des pins étudiés. Des symptômes macroscopiques et microscopiques typiques de l'ozone étaient observables, en tous cas, dans l'arrière pays. Ils indiquaient un état de stress et une accélération de la sénescence des aiguilles symptomatiques chez les pins cembro. L'ozone est un facteur de stress contribuant probablement au mauvais état sanitaire du pin cembro dans les Alpes-Maritimes. Le rôle relatif de l'ozone et des autres facteurs de stress, notamment les sécheresses à répétition et les changements climatiques récents, nécessitent la poursuite des recherches.

Summary

Ozone and coniferous species in South-East France

In South-East France, major loss of leaves by several coniferous species has been recorded in association with high concentrations of ozone. Recent research has made it possible to distinguish the symptoms specifically related to ozone in the leaves and needles from those caused by other stress factors. This study presents the levels of ozone measured in the year 2000 along the coast and in the hinterland near Nice and compares them to the degree of loss of colour and leaves observed on five coniferous species. On *P. cembro*, needles were taken to detect and verify the presence of specifically ozone-related symptoms. Ozone levels were sufficient to produce visible symptoms and, probably, to affect the trees' growth. In any event, macro- and microscopic symptoms typically due to ozone were observable in the hinterland. They indicated a state of stress and an acceleration in the ageing of the needles for the *P. cembro*. Ozone is no doubt a factor contributing to the poor state of health of this species in the Alpes-Maritimes *département*. The extent of the role played by ozone as opposed to that of other stress factors, notably repeated drought conditions and recent changes in climate, requires further research.

Riassunto

L'ozono e le conifere del sud-est della Francia

Nel sud-est della Francia sfogliazioni importanti su alcune specie di conifere si osservano parallelamente a forti concentrazioni di ozono. La ricerca recente permette di discriminare i sintomi specifici di ozono nelle foglie o gli aghi rispetto alle alterazioni cagionate da altri fattori di stress. Questo studio presenta i livelli di ozono misurati nel 2000 sul litorale e nel entroterra di Nizza e li paragona ai tassi di decolorazione e di sfogliazione osservati su cinque specie di conifere. Sul pino cembro, aghi sono stati prelevati per rivelare e verificare la presenza di sintomi specifici di ozono. I livelli di ozono misurati erano sufficienti per cagionare sintomi visibili e, probabilmente, per intaccare la crescita dei pini studiati. Sintomi macroscopici e microscopici tipici dell'ozono erano osservabili, in ogni caso, nel entroterra. Indicavano uno stato di stress e un'accelerazione della senescenza degli aghi sintomatica presso il pino cembro. L'ozono è un fattore di stress che contribuisce al pessimo stato sanitario del pino cembro nelle Alpi-Maritime. La parte relativa dell'ozono e degli altri fattori di stress, particolarmente le siccità a ripetizione e i cambiamenti climatici recenti, necessitano il proseguimento delle ricerche.