Zeitschrift: Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 41 (1988)

Heft: 3: Archives des sciences

Artikel: Variations saisonnières d'indicateurs biochimiques chez l'épicéa (Picea abies L. [Karst]) de la forêt genevoise : corrélation avec le taux en polluants atmosphériques (dioxyde de soufre et ozone)

Autor: Castillo, Federico J. / Ogier, Guillaume / Miller, Paul R.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-740398

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 31.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Archs. Sci. Genève	Vol. 41	Fasc. 3	pp. 345-363	1988

VARIATIONS SAISONNIÈRES D'INDICATEURS BIOCHIMIQUES CHEZ L'ÉPICÉA *(PICEA ABIES* L. [KARST]) DE LA FORÊT GENEVOISE: CORRÉLATION AVEC LE TAUX EN POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES (DIOXYDE DE SOUFRE ET OZONE)

PAR

Federico J. CASTILLO [1], Guillaume OGIER [1], Paul R. MILLER [2] et Hubert GREPPIN [1]

RÉSUMÉ

L'activité et le taux d'indicateurs biochimiques de la pollution atmosphérique (peroxydase, superoxydismutase, acide ascorbique) ont été mesurés dans les aiguilles d'épicéas de la forêt de Versoix (Genève, Suisse) pendant une période de quinze mois (1985-1986). L'évolution des activités enzymatiques et de la concentration en ozone atmosphérique montre une corrélation positive, tandis que celle de la concentration en acide ascorbique montre une corrélation négative avec ce même polluant. La fiabilité de l'emploi de ces paramètres biochimiques comme indicateurs précoces des dommages provoqués par la pollution atmosphérique dans un écosystème naturel est discutée.

Mots clefs: peroxydase, superoxydismutase, acide ascorbique, épicéa, ozone, dioxyde de soufre.

SUMMARY

Seasonal variation of biochemical indicators of Norway spruce and its correlation with atmospheric levels of pollutants (sulfur dioxide and ozone). — Biochemical indicators of atmospheric pollutants (peroxidase, superoxide dismutase, ascorbic acid) have been measured in needles of Norway spruce from the Versoix forest (Geneva, Switzerland) during a period of 15 months (1985-1986). The evolution of enzymatic activities is positively correlated with the seasonal variation of ozone whereas the evolution of ascorbic acid concentration is negatively correlated with this pollutant. The applicability of these biochemical parameters as indicators of pollution injury in a natural ecosystem is discussed.

Key words: peroxidase, superoxide dismutase, ascorbic acid, Norway spruce, ozone, sulfur dioxide.

[1] Département de Biologie végétale, Université de Genève, CH-1211 Genève 4.

[2] USDA Forest Service, Riverside, California 92507, USA.

INTRODUCTION

Ces dernières années, un dépérissement des forêts *(Waldsterben)* très important a été constaté en Suisse, en Allemagne et dans d'autres pays européens (Schütt et Cowling, 1985); ceci constitue un des plus gros problèmes d'environnement que l'Europe connaît en cette fin du XXe siècle. Malgré l'intérêt scientifique porté à ce sujet et les travaux actuels en cours, les causes de ce dépérissement sont encore mal connues (Hinrichsen, 1986). Différentes espèces d'arbres sont touchées, le sapin blanc *(Abies alba),* l'épicéa *(Picea abies),* le pin sylvestre *(Pinus sylvestris),* le hêtre *(Fagus sylvatica),* entre autres. Les dommages causés à l'épicéa (Rapport Sanasilva, 1986 et 1987), une espèce dominante en Suisse, est d'une importance toute particulière étant donné son intérêt économique.

Il est admis sans controverse que plusieurs paramètres peuvent être incriminés dans le dépérissement forestier: carences en éléments nutritifs et minéraux, événements climatiques défavorables, erreurs d'aménagement forestier, parasites ou infection des arbres. Cependant, ces facteurs à eux seuls ne peuvent pas être considérés comme la cause d'un dommage général, très étendu, observé dans les écosystèmes forestiers de toute l'Europe. A ce jour, un certain nombre d'hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène: l'acidité du sol (pluies acides), les polluants photooxydants (par exemple, l'ozone), la déficience en Mg, un excès d'azote ou d'autres nutriments, la présence de substances organiques dans l'air qui altèrent la croissance, des infections par des organismes comme les mycoplasmes ou les rickettsias, l'hypothèse d'une situation générale de stress, etc. (Blank, 1985; Schütt et Cowling, 1985).

L'hypothèse qui implique les polluants atmosphériques (ozone et brouillard acide) est la plus largement acceptée pour expliquer ce nouveau type de dépérissement. Cependant, elle n'est fondée que sur des évidences circonstantielles, et nous avons donc besoin de données expérimentales pour la vérifier. Actuellement, nous disposons, par exemple, de preuves irréfutables de l'existence de concentrations élevées d'ozone dans les forêts (ainsi des valeurs de 120-150 µg O_3/m^3 ont été mesurées en été au sud de l'Allemagne, avec des maxima horaires pouvant atteindre 358 µg O_3/m^3, Rieter, 1983). Mais surtout l'impact négatif de l'ozone sur des espèces différentes de conifères et sur leurs écosystèmes associés a été démontré (McLaughlin *et al.,* 1982; Miller *et al.,* 1982).

Les polluants atmosphériques provoquent très fréquemment l'apparition de taches et de nécroses sur les feuilles des arbres. Ces dommages visibles constituent l'annonce imminente de la mort cellulaire. Mais bien avant le développement de ces symptômes macroscopiques, certains changements précoces dans les fonctions biochimiques et physiologiques ont lieu dans les cellules (altération de la balance ionique, des échanges gazeux, de la structure de la paroi cellulaire et des membranes, des processus de transport, etc., Heath, 1980). Ces modifications métaboliques constituent les dommages invisibles.

Les polluants induisent donc une situation générale de stress qui affecte le métabolisme tout entier de la plante. Des travaux ont montré, en particulier, qu'ils peuvent inhiber ou activer certains systèmes enzymatiques (Castillo et Greppin, 1986; Heath, 1980; Tanaka et Sugahara, 1980); le suivi de ces systèmes permettrait de détecter précocement les effets toxiques des polluants atmosphériques. Mais ces mesures enzymatiques sont d'une utilisation difficile car les polluants agissent sur les enzymes de manières différentes avec des effets pouvant être synergiques ou antagonistes et susceptibles de connaître des variations qualitatives et quantitatives au cours du temps.

La présence de certains polluants à l'intérieur des feuilles conduit à la formation de substances très toxiques (radicaux libres, peroxyde d'hydrogène et autres peroxides lipidiques, Elstner *et al.,* 1985). Ces substances peuvent non seulement modifier de façon importante l'équilibre rédox, mais provoquer aussi la peroxydation des lipides membranaires et la destruction de la chlorophylle (Heath, 1980). L'évitement de ces dommages serait en partie possible par la mise en œuvre de mécanismes de détoxication et de défense contre les polluants. Certaines enzymes et métabolites (peroxydases, superoxydismutase, acide ascorbique, etc.) sont associés à ces mécanismes de détoxication des composés oxydants. Ces paramètres biochimiques peuvent être utilisés comme indicateurs rapides de l'action des polluants atmosphériques, avant l'apparition des dommages visibles. En corrélant entre eux plusieurs indicateurs biochimiques on pourrait établir un diagnostic précoce sur l'état sanitaire d'une espèce végétale particulière et ainsi avoir plus de temps pour mener une politique adéquate d'assainissement.

Des études expérimentales en conditions contrôlées (chambres de fumigation semi-ouvertes) ont déjà été réalisées et ont montré que ces paramètres répondent de façon satisfaisante à l'ozone, notamment lorsqu'ils sont mesurés dans l'espace extracellulaire des aiguilles d'épicéa (Castillo *et al.,* 1987). Dans ce travail nous présentons des résultats concernant ces indicateurs biochimiques obtenus lors des mesures effectuées en 1985 et 1986, avec des épicéas de la forêt de Versoix (Genève, Suisse).

Notre objectif était d'étudier l'évolution de ces paramètres biochimiques pendant un cycle annuel et de déceler une éventuelle corrélation entre les fluctuations des valeurs mesurées et celles des niveaux de polluants atmosphériques. Ceci nous permettrait, alors, d'analyser la fiabilité de l'emploi de ces paramètres au titre d'indicateurs de la pollution atmosphérique des arbres adultes, situés dans leur environnement naturel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur deux épicéas (*Picea abies* [L.] Karst) situés dans la forêt de Versoix (Genève, Suisse): 46°8'30'' N, 6°8'10'' E, altitude 450 m. Le

matériel végétal est constitué d'aiguilles prélevées sur les deux arbres d'âges différents: un grand épicéa (66,3 cm ∅ à 1,5 m du sol) et un petit (9,8 cm ∅) distant d'environ 15 m. Ces arbres sont partie intégrante de la forêt, mais sont isolés. Ils se trouvent au centre d'une clairière; ils ne reçoivent pas d'ombre, si ce n'est au tout début et à la fin de la journée. Leur état sanitaire apparent est satisfaisant (absence de dommages visibles).

Echantillonnage

L'échantillonnage a eu lieu de juin 1985 à août 1986, pendant les mois suivants: juin, juillet, septembre, décembre 1985 et février, mars, juin, août 1986. Deux régions différentes de la couronne de chaque arbre ont été choisies pour le prélèvement des échantillons: la région ensoleillée (sud) et la région ombragée (nord). Dans chaque région des rameaux ont été prélevés à la même heure le matin (9: 30), à une hauteur de 1,5-2 m du sol. Les rameaux ont été coupés au-dessous de la génération 1983. Le côté coupé a été placé dans l'eau distillée, et le tout transporté rapidement au laboratoire. Seules les aiguilles en bon état, sans dommages apparents ont été prélevées pour analyse. Des aiguilles des années 1984 et 1985 ont été sectionnées des tiges pour chaque région de la couronne. Chaque échantillon est un mélange d'aiguilles provenant de 4 rameaux (la standardisation est fondamentale pour minimiser les effets dus à la variabilité intrinsèque de l'échantillon).

Méthodes d'extraction et dosages

Le fluide extracellulaire est obtenu par la technique d'infiltration (Castillo *et al.,* 1987). Les aiguilles (10 g/échantillon) sont infiltrées sous vide (−65 kPa) avec un tampon adéquat, puis séchées en surface avec du papier absorbant et ensuite centrifugées à 4° C (1 000 × g pendant 10 min) dans des tubes perforés (le tube inférieur, qui contient les aiguilles a le fond perforé). Le fluide extracellulaire, recueilli dans le tube inférieur, est maintenu à 4° C pour l'analyse des paramètres suivants: activités enzymatiques, teneur en acide ascorbique et teneur en protéines. Le matériel végétal restant après centrifugation des aiguilles est congelé dans de l'azote liquide (−196° C) pour sa conservation en vue de son utilisation ultérieure.

Pour la détermination des activités enzymatiques extracellulaires, le milieu d'infiltration est un tampon phosphate de K (66 mM, pH 7) et 0,1 M KCl. Les extraits servant à mesurer les activités enzymatiques et la teneur en protéines du matériel cellulaire sont préparés à partir de 0,5 g d'aiguilles broyées en présence de 0,5 g de polyvinylpyrrolidone (PVP) et 3 ml de tampon d'extraction (phosphate de K, 66 mM, pH 7,8), dans un microdismembrateur Braun. Les activités enzymatiques sont

mesurées à partir du surnageant obtenu après centrifugation de l'extrait brut à 10 000 × g pendant 15 min.

L'activité peroxydasique est mesurée à 25° C, dans du tampon phosphate de K (60 mM, pH 6,1), 16 mM gaïacol, 3,3 mM H_2O_2 et 10-50 µl d'extrait. L'augmentation de l'absorbance à 470 nm est enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 1700.

L'activité superoxydismutase est mesurée par l'inhibition de la réduction photochimique du NBT (nitrobluetetrazolium), selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1974). Le milieu réactionnel (1 ml) contient du tampon phosphate de K (50 mM, pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM methionine, 75 µM NBT, 2 µM riboflavine et 0-50 µl d'extrait enzymatique. La riboflavine est ajoutée en dernier, et les tubes sont placés sous une lumière fluorescente. La réaction se déroule pendant 10 min ou jusqu'à ce que l'absorbance à 500 nm dans les tubes de contrôle atteigne 0,2. Une unité d'activité enzymatique est définie comme le volume d'extrait nécessaire pour inhiber de 50% le niveau de l'absorbance mesurée dans les tubes de contrôle. Aucune interférence due à la présence d'acide ascorbique n'a été observée pendant l'essai de l'activité superoxydismutase.

La teneur en protéines est mesurée par la méthode de Bradford (1976), avec comme standard l'albumine de sérum de bœuf (BSA).

Le milieu d'infiltration pour la détermination de l'acide ascorbique extracellulaire est un tampon acétate de Na (40 mM, pH 4,5), 2,5 mM EDTA et 0,1 M KCl. L'acide ascorbique du matériel cellulaire est extrait avec une solution froide (4° C) d'acide métaphosphorique 0,4 M et 0,25 mM EDTA. L'acide ascorbique est mesuré dans le surnageant obtenu après centrifugation de l'extrait brut à 20 000 × g pendant 15 min. L'acide ascorbique est déterminé par chromatographie liquide (HPLC modèle Varian 5000). La séparation se fait à l'aide d'une colonne analytique de 15 cm × 4 mm MicroPak MCH-5-N-CAP protégée par une précolonne. L'éluant est une solution aqueuse à 2% de $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 2,8 avec de l'acide phosphorique concentré, et son débit à travers la colonne est de 1 ml/min. La pression est de 120 atm. Le détecteur est fixé à 254 nm.

Statistique

Chaque point dans les graphiques est la moyenne de 4 mesures différentes. Le coefficient de variation a été calculé pour toutes les valeurs, et il est compris entre 8 et 22% de la moyenne. L'analyse de variance a été utilisée pour détecter l'existence de variations significatives des paramètres biochimiques entre les deux régions (ensoleillée et ombragée) de la couronne. Les coefficients de corrélation r entre les paramètres biochimiques et les polluants atmosphériques (dioxyde de soufre et ozone) ont aussi été calculés (Philippe, 1967).

Analyse de l'air

Les valeurs des concentrations de l'ozone et du dioxyde de soufre dans l'air mesurées dans deux stations du canton de Genève (Jussy et Anières), ont été fournies par le Service d'écotoxicologie du canton de Genève.

RÉSULTATS

Sur la figure 1 sont présentées les valeurs moyennes mensuelles des concentrations en dioxyde de soufre et ozone atmosphériques mesurées à Jussy et Anières depuis janvier 1985 jusqu'à août 1986. Ces polluants atmosphériques n'ont pas été mesurés à Versoix, mais la teneur de ceux-ci, pour cette forêt, serait comprise entre celles mesurées à Jussy et Anières (Service d'écotoxicologie, Genève). Les immissions de

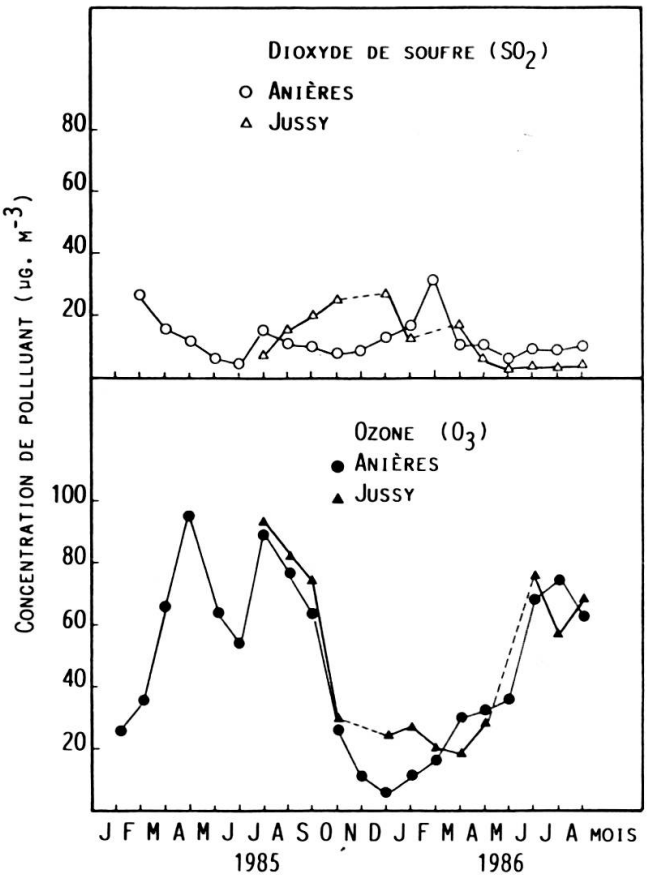

FIGURE 1.

Valeurs moyennes mensuelles de la concentration de dioxyde de soufre et d'ozone atmosphérique, à Jussy et Anières, depuis janvier 1985 jusqu'à août 1986. La moyenne mensuelle correspond à la valeur moyenne de toutes les moyennes semi-horaires du mois considéré. Source: Service cantonal d'écotoxicologie, Genève.

dioxyde de soufre sont assez faibles (les plus basses des stations mesurées à Genève) avec un minimum de 4 µg/m³ en été et un maximum de 32 µg/m³ en hiver. La charge en ozone est plus élevée au printemps et en été, lorsqu'il y a une augmentation du rayonnement solaire. Ceci donne une évolution typique de la teneur en ozone avec des valeurs minimales en hiver (10-30 µg/m³) et maximales au printemps et en été (70-100 µg/m³).

TABLEAU 1.

Valeurs cumulées depuis les mois de janvier 1985 et 1986, des moyennes mensuelles de SO_2 et de O_3 à Anières, pour les mois où les échantillons ont été faits.

		SO_2	O_3
		µg/m³	
1985*	Juin	80	342
	Juillet	95	432
	Septembre	116	573
	Novembre	125	611
1986	Février	48	28
	Avril	68	90
	Juin	83	194
	Août	102	332

* La valeur du SO_2 de janvier 1985 étant inconnue; nous avons pris celle de janvier 1986.

Le tableau 1 indique les valeurs cumulées de ces deux polluants depuis le mois de janvier des années 1985 et 1986. On peut constater que la charge accumulée d'ozone a été beaucoup plus importante pendant l'année 1985 (deux pics importants au printemps et en été) que pendant l'année 1986.

Pour information complémentaire, nous présentons les valeurs moyennes mensuelles des températures journalières relevées à Genève-Cointrin pendant la période de notre étude (figure 2).

Dommages visibles

Quelques dommages ont parfois été observés sur les aiguilles de la génération 1984 du grand épicéa. Ces dommages peuvent être décrits comme des bandes et des points jaunes sur les aiguilles des branches de la région ombragée de la couronne. Ce type de dommage n'a jamais été observé dans la région ensoleillée de la couronne.

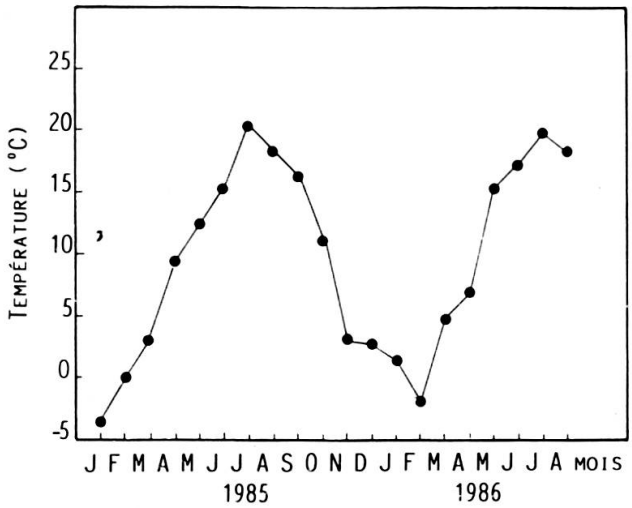

FIGURE 2.

Valeurs moyennes mensuelles des températures journalières moyennes relevées à Genève-Cointrin depuis janvier 1985 jusqu'à août 1986. Source: Service de climatologie de la Suisse romande, Institut suisse de météorologie.

Activités enzymatiques

L'activité enzymatique extracellulaire suit une évolution semblable au cours de l'année chez le grand et le petit épicéa. Le maximum d'activité est constaté en juin-juillet et le minimum en décembre. Il n'y a pas de différences significatives entre les activités mesurées dans la région ensoleillée et la région ombragée de la couronne. L'activité peroxydasique des aiguilles 1985 est très faible au début de l'expérience (ces aiguilles n'ont que trois mois d'âge lorsque les premiers échantillons ont été prélevés), et reste en dessous des activités mesurées dans les aiguilles 1984. Le maximum d'activité coïncide avec les pics d'ozone observés en juillet 1985 et en juillet 1986. Puis, l'activité peroxydasique diminue nettement (septembre 1985), ou reste stabilisée (août 1986). L'activité dans les aiguilles 1985 continue d'augmenter en août 1986. Une corrélation positive et significative ($p < 0{,}05$) existe entre l'évolution de l'ozone et l'évolution de l'activité peroxydasique extracellulaire dans les aiguilles 1984, mais pas avec celle des aiguilles 1985. La corrélation est par contre négative et non significative avec les concentrations de dioxyde de soufre.

L'activité peroxydasique totale (c'est-à-dire mesurée dans le matériel cellulaire) suit à peu près la même évolution que celle de l'espace extracellulaire. Cependant, une différence importante est constatée: le maximum d'activité, en 1985, ne coïncide pas avec le pic maximum d'ozone en juillet 1985, mais il est déplacé vers le mois de septembre 1985 et août 1986. Cette activité peroxydasique totale continue donc d'augmenter lorsque la concentration en ozone reste élevée et ne diminue qu'à la fin de l'automne. Il faut aussi souligner l'ampleur de la réponse pendant l'année 1985

par rapport à celle de l'année 1986. Comme cela a été constaté précédemment, une corrélation positive et significative existe entre l'évolution de la concentration en ozone et celle de l'activité peroxydasique des aiguilles 1984 du grand épicéa.

L'enzyme superoxydismutase a son maximum d'activité au début de l'été, en juin 1985 et en juin 1986, avec un minimum d'activité en hiver. Aucune différence significative n'a été observée entre la région ombragée et la région ensoleillée de la couronne. Une chute importante de l'activité a lieu en septembre 1985, à la suite de l'épisode de concentration élevée d'ozone de juillet-septembre 1985. De même que l'activité peroxydasique, l'activité superoxydismutase extracellulaire est très faible dans les aiguilles jeunes (1985); leur activité est 3 fois plus faible que celle des aiguilles âgées.

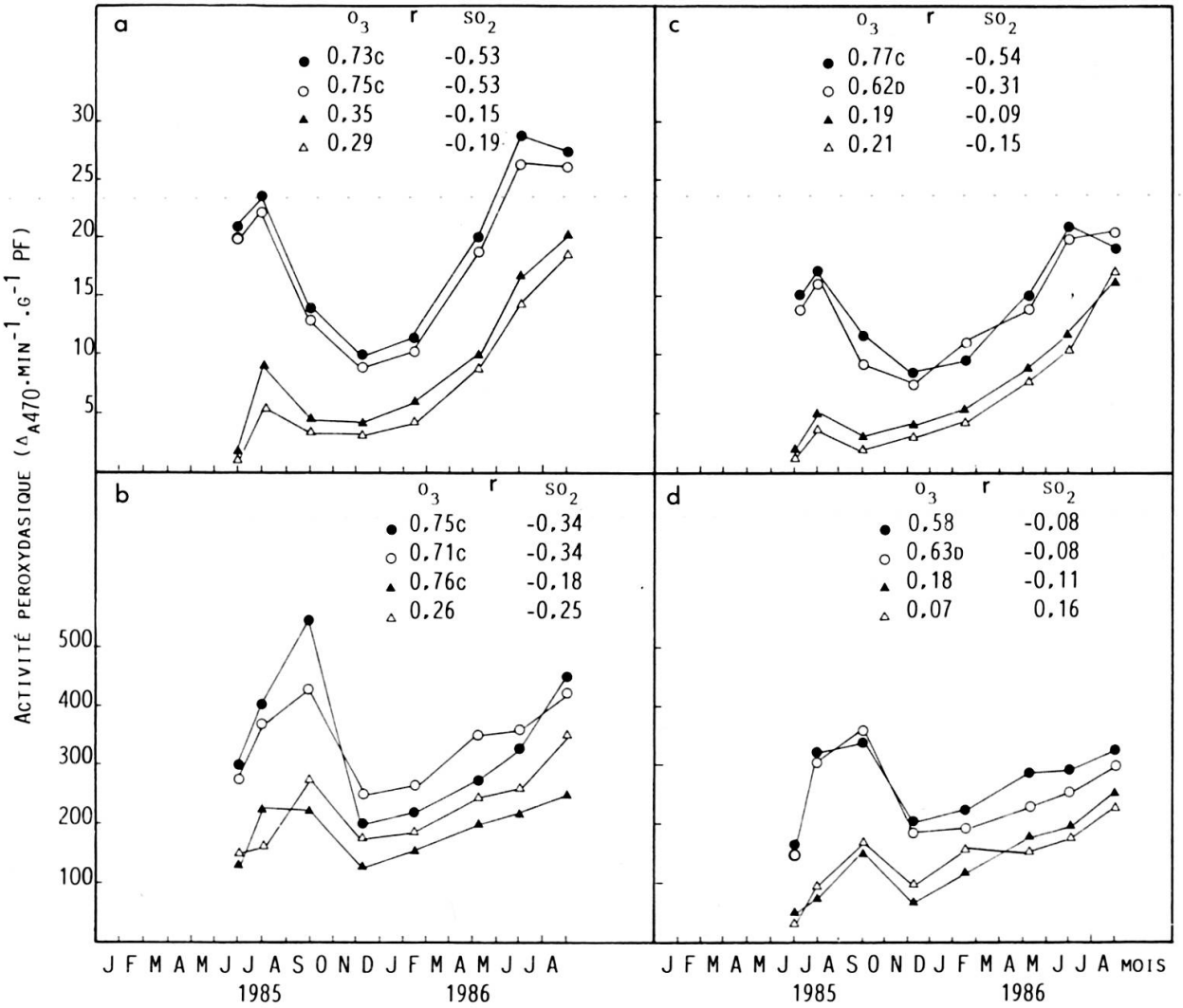

FIGURE 3.

Evolution de l'activité gaïacol peroxydase dans le fluide extracellulaire (a,c) et dans le matériel cellulaire (b,d) des aiguilles d'épicéa. Grand épicéa (a,b); petit épicéa (c,d). Aiguilles 1984 (●, ○); 1985 (▲, △). Région de la couronne: ensoleillée (●, ▲); ombragée (○, △). Seuil de probabilité (P%) pour le coefficient de corrélation r: A (0,1-1); B (1-2); C (2-5); D (5-10).

Une différence de réponse est constatée entre les aiguilles des années 1984 et 1985. En effet, les aiguilles âgées ont leur activité superoxydismutase extracellulaire qui diminue de juin 1985 jusqu'à septembre 1985, tandis que dans les aiguilles jeunes, elle augmente au début (juillet 1985) puis reste stabilisée (septembre 1985). Le même type d'évolution est constaté pour l'activité de cette enzyme aussi bien chez le grand que le petit épicéa. Une corrélation positive et significative ($p < 0,1$) de cette activité dans les aiguilles 1984 existe en rapport avec l'évolution de la concentration d'ozone. Le matériel cellulaire a une activité élevée de la superoxydismutase à la fin de l'été (août et septembre) et faible en hiver. L'évolution est semblable dans les aiguilles des années 1984 et 1985 du grand et du petit épicéa. En général, une bonne corrélation existe entre cette activité enzymatique et l'évolution de la concentration d'ozone dans

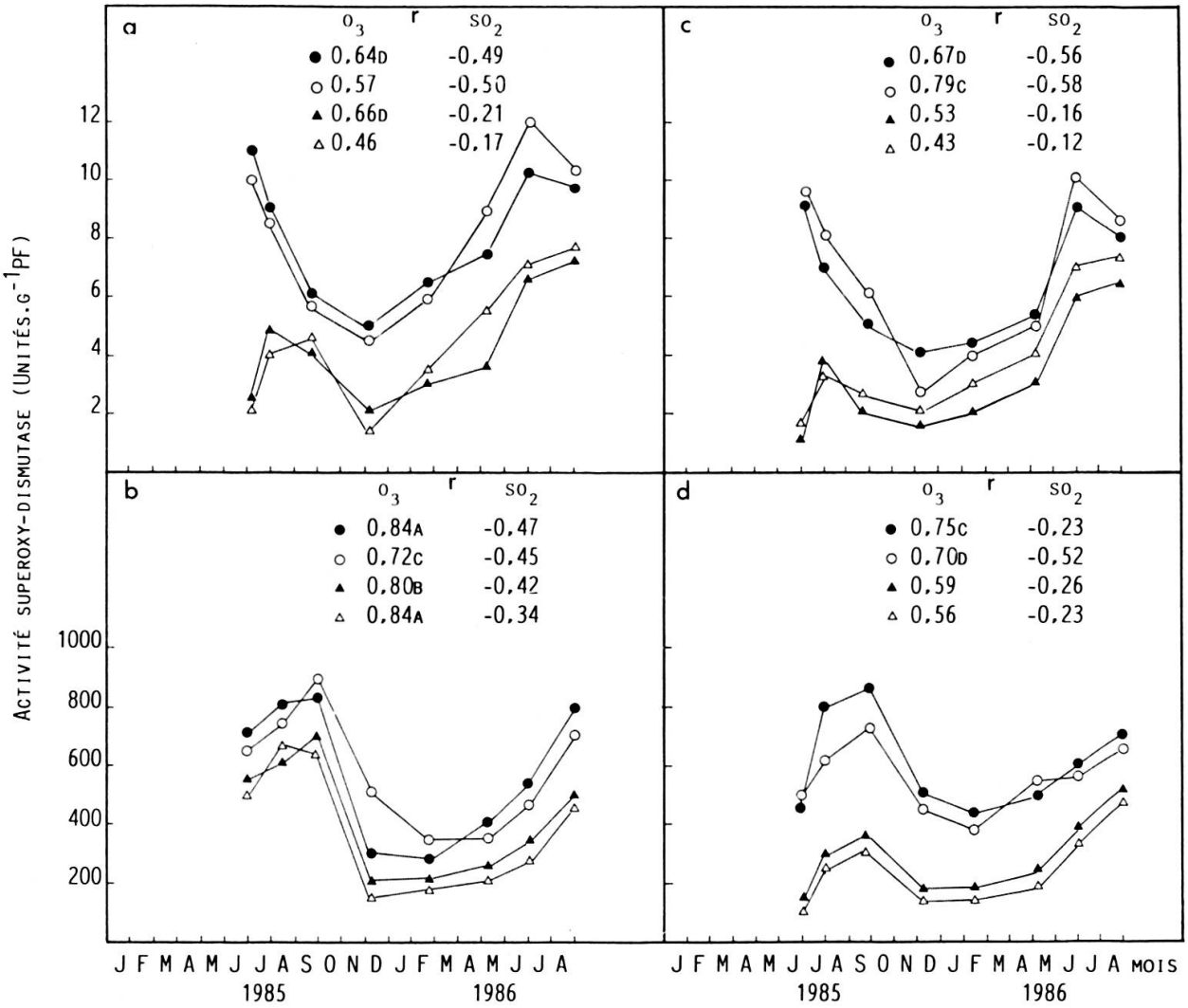

FIGURE 4.

Evolution de l'activité superoxydismutase dans le fluide extracellulaire (a,c) et dans le matériel cellulaire (b,d) des aiguilles d'épicéa. Grand épicéa (a,b); petit épicéa (c,d). Aiguilles 1984 (●, ○); 1985 (▲, △). Région de la couronne: ensoleillée (●, ▲); ombragée (○, △). Seuil de probabilité (P%) pour le coefficient de corrélation r: A (0,1-1); B (1-2); C (2-5); D (5-10).

les aiguilles 1984 et 1985 du grand épicéa. Chez le petit épicéa, l'évolution de la superoxydismutase est semblable à celle du grand arbre, mais avec des différences plus marquées entre les aiguilles des années 1984 et 1985.

Acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique, mesuré dans le fluide extracellulaire, a des valeurs maximales en septembre 1985 et en avril 1986, avec des taux minimaux en hiver. Les aiguilles de l'année 1985 ont une très faible concentration d'acide ascorbique, lorsqu'elles sont encore très jeunes (3-4 mois). Des différences significatives ($P < 0{,}05$) sont observées entre la teneur en acide ascorbique en avril 1986, des aiguilles des années 1984 et

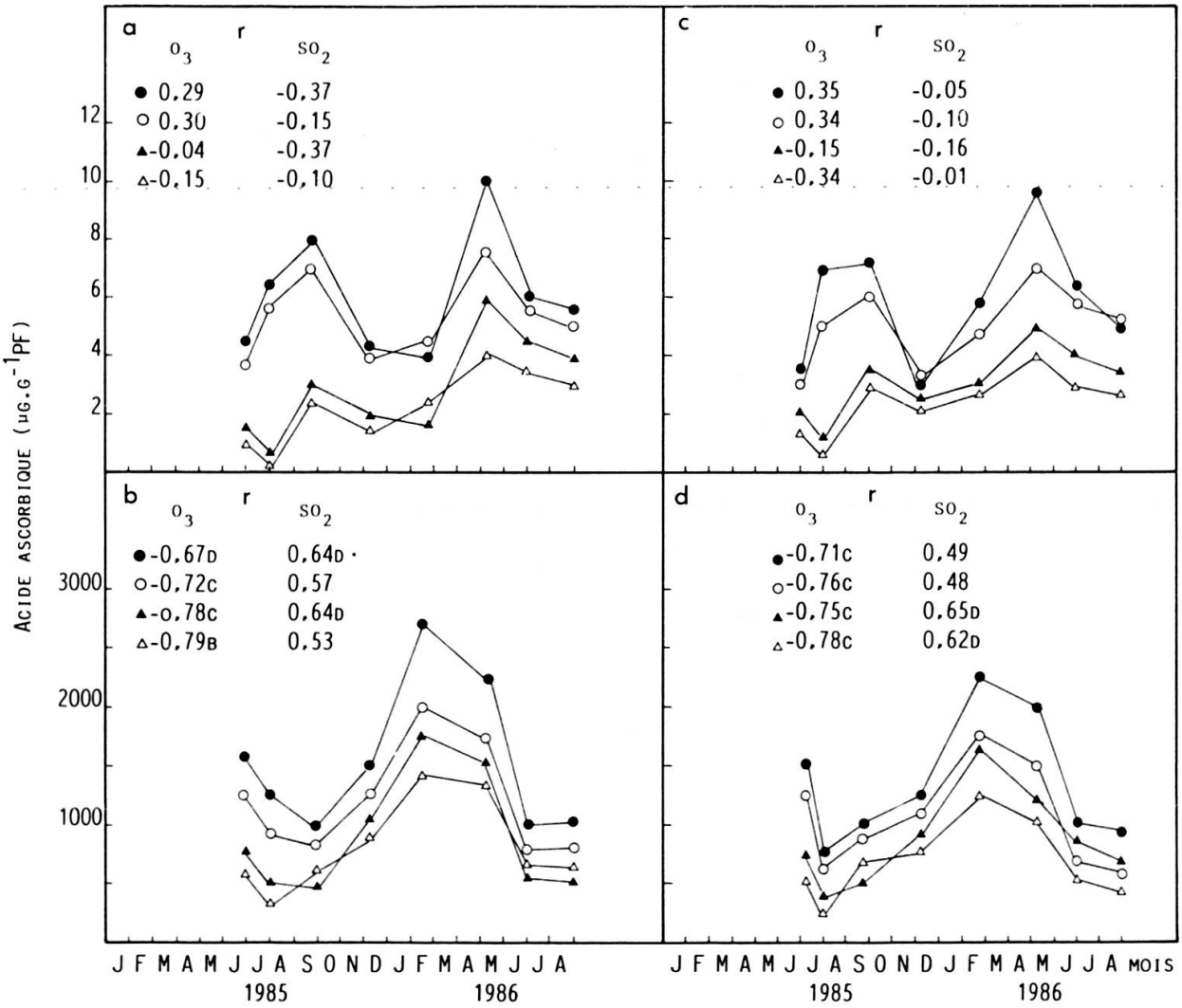

FIGURE 5.

Evolution de la teneur en acide ascorbique dans le fluide extracellulaire (a,c) et dans le matériel cellulaire (b,d) des aiguilles d'épicéa. Grand épicéa (a,b); petit épicéa (c,d). Aiguilles 1984 (●, ○); 1985 (▲, △). Région de la couronne: ensoleillée (●, ▲); ombragée (○, △). Seuil de probabilité (P%) pour le coefficient de corrélation r: A (0,1-1); B (1-2); C (2-5); D (5-10).

1985 selon que les aiguilles proviennent de la région ensoleillée ou ombragée de la couronne. La teneur maximale d'acide ascorbique extracellulaire au mois d'avril 1986 est suivie d'une chute très importante en juillet-août 1986, qui est simultanée des niveaux élevés d'ozone pendant cette période. L'évolution de l'acide ascorbique extracellulaire est semblable chez le grand et le petit épicéa.

Les valeurs maximales d'acide ascorbique total (matériel cellulaire) sont atteintes en hiver (février 1986), contrairement à ce qui est observé pour les activités enzymatiques. L'évolution est semblable dans les aiguilles 1984 et 1985, et ceci pour le grand et le petit épicéa. Ces valeurs maximales d'acide ascorbique total correspondent aux valeurs minimales extracellulaires observées chez le grand épicéa. Elles sont bien corrélées ($p<0,1$) avec les températures basses de l'hiver et les niveaux plus élevés

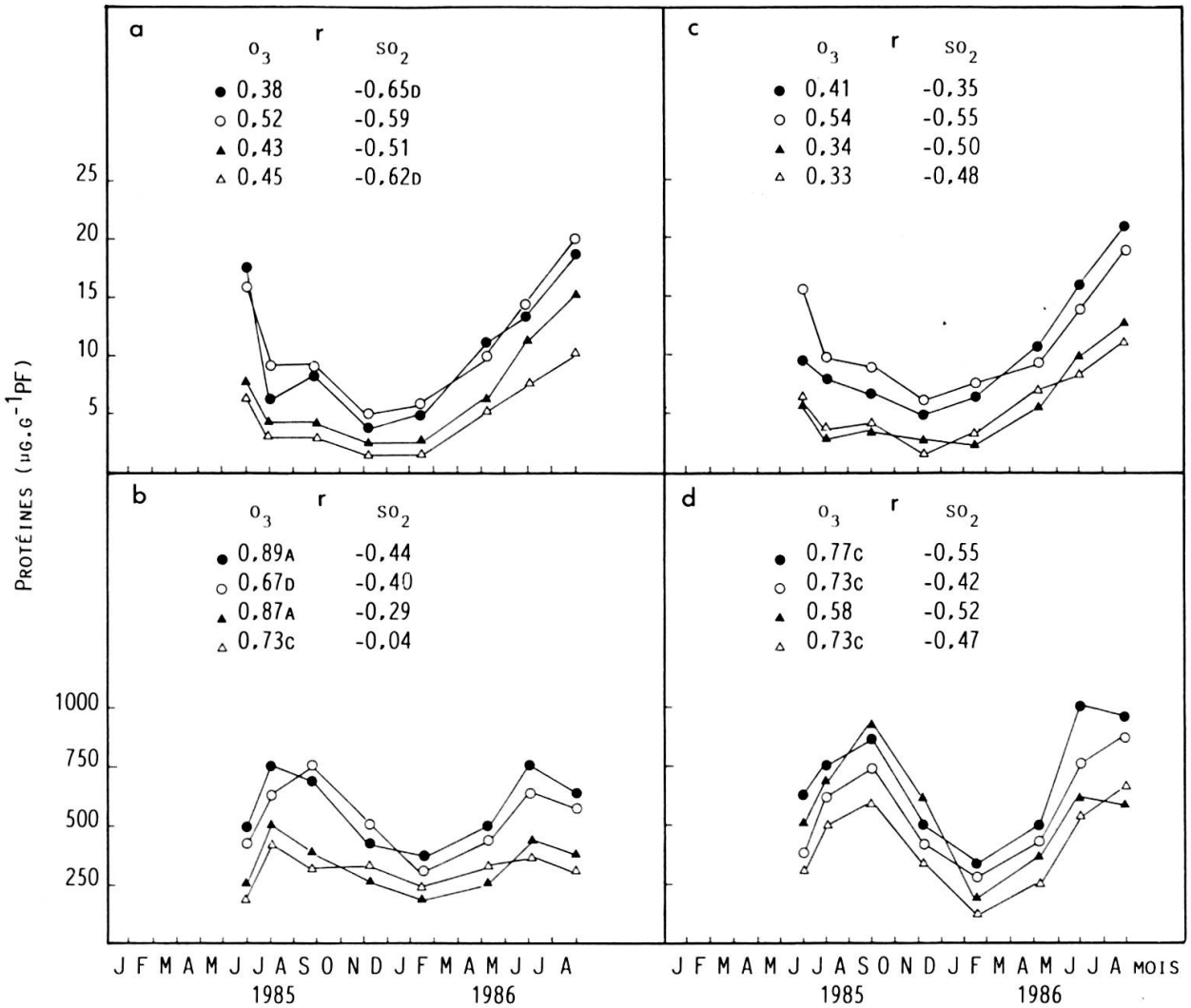

FIGURE 6.

Evolution de la teneur en protéines dans le fluide extracellulaire (a,c) et dans le matériel cellulaire (b,d) des aiguilles d'épicéa. Grand épicéa (a,b); petit épicéa (c,d). Aiguilles 1984 (●, ○); 1985 (▲, △). Région de la couronne: ensoleillée (●, ▲); ombragée (○, △). Seuil de probabilité (P%) pour le coefficient de corrélation r: A (0,1-1); B (1-2); C (2-5); D (5-10).

de dioxyde de soufre à cette saison. Les aiguilles de l'année 1984 de la région ensoleillée et de la région ombragée de la couronne montrent des différences significatives dans leur teneur en acide ascorbique, en février et en avril 1986. Cette grande augmentation de la teneur en acide ascorbique pendant l'hiver et le printemps 1986 est suivie d'une diminution très importante, qui coïncide, une fois de plus, avec la présence de concentrations élevées d'ozone dans l'air en juin-août 1986. Une corrélation négative et significative est constatée entre l'acide ascorbique et l'ozone, pour toutes les aiguilles analysées.

Protéines

La concentration en protéines mesurée dans le fluide extracellulaire montre un minimum en hiver et un maximum en été. Des différences significatives n'ont pas été détectées entre les aiguilles des régions ensoleillées et ombragées. L'évolution est semblable chez le grand et le petit épicéa. Une chute importante est constatée en juillet 1985, chute qui coïncide avec le deuxième pic d'ozone en juillet 1985. Néanmoins, la corrélation entre l'évolution de la concentration d'ozone et la teneur en protéines extracellulaires reste faible. Les protéines totales ont aussi une valeur minimale en hiver et maximale en été. Pendant cette saison, les niveaux restent relativement élevés pour diminuer en automne. Ces fluctuations sont plus importantes chez le petit épicéa. Une bonne corrélation est observée entre l'évolution des protéines totales et celle de la concentration d'ozone.

DISCUSSION

Les conditions météorologiques influencent la déposition des polluants de l'air au niveau de la couronne des arbres; l'entrée et l'action de ces polluants à l'intérieur de la feuille dépendent de facteurs écophysiologiques. Dans un environnement si complexe, l'interaction entre tous ces phénomènes est encore mal comprise, et nous amène à poser la question : «Comment les effets de la pollution atmosphérique peuvent-ils être séparés des autres facteurs écologiques agissant dans un écosystème naturel?». Lors de cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence une association entre des paramètres biochimiques mesurés dans la feuille et la concentration de polluants atmosphériques comme l'ozone et le dioxyde de soufre.

Peroxydases

Les taux assez faibles de dioxyde de soufre (<32 µg/m^3), en hiver, ne semblent pas influencer l'activité peroxydasique, ce qui confirmerait des résultats précédents

(Katainen *et al.,* 1984; Khan et Malhotra, 1982), montrant que les peroxydases des conifères sont seulement affectées lorsque la concentration en dioxyde de soufre est plus élevée (>50 µg/m^3). Le fait que les coefficients de corrélation calculés pour l'activité peroxydasique et le taux en dioxyde de soufre soient toujours négatifs, et en général assez faibles, conforte cette idée.

Des concentrations relativement élevées et continues d'ozone (juillet-septembre 1985) auraient une influence négative (inhibition) sur l'activité peroxydasique extracellulaire, tandis que l'activité peroxidasique cellulaire serait stimulée. Ce comportement différent est illustré par le décalage du pic maximum d'activité dans les deux compartiments. Néanmoins, la corrélation entre la concentration d'ozone et l'activité peroxydasique est semblable dans les deux compartiments des aiguilles 1984 du grand épicéa. Une corrélation positive de cette activité avec l'ozone et la température a aussi été observée par Jokinen (1983) chez *Pinus silvestris.* L'intensité de la lumière, plus élevée en été, pourrait aussi jouer un rôle important dans l'activation des enzymes impliquées dans la destruction des radicaux libres (par exemple, l'ascorbate peroxydase, Gillham et Dodge, 1987). Il est intéressant de constater que l'augmentation de l'activité peroxydasique est accompagnée par une diminution de la teneur en acide ascorbique, celui-ci pouvant agir comme donneur d'électrons de la peroxydase (Castillo et Greppin, 1986).

Superoxydismutase

L'inhibition de la superoxydismutase extracellulaire en juillet-septembre 1985, simultanée à l'épisode important d'augmentation de l'ozone, est révélatrice d'un effet marquant de ce gaz sur les aiguilles 1984. Cet effet qui a lieu chez le grand et le petit épicéa est contraire à celui observé sur des aiguilles de l'année 1985. La corrélation étroite entre les évolutions de l'activité superoxydismutase et de l'ozone pourrait être expliquée par le fait que cette enzyme pourrait être induite par l'ozone (Tanaka et Sugahara, 1980). La réponse de l'enzyme serait réversible: la disparition de l'ozone provoquerait à son tour la diminution de l'activité enzymatique. Cette interprétation serait aussi valable pour l'activité extracellulaire; elle serait soit induite par l'ozone, soit inhibée lorsqu'un seuil de concentration est dépassé (par exemple, juillet-septembre 1985 au-dessus de 70 µg O_3/m^3).

Acide ascorbique

L'évolution des teneurs en acide ascorbique dans le fluide extracellulaire et dans le matériel cellulaire est complémentaire; les valeurs maximales extracellulaires correspondent aux valeurs minimales cellulaires, et vice versa. Les valeurs cellulaires changent selon un rythme saisonnier, avec un maximum en février (1,5-2,7 mg/g

PF) et un minimum en juillet-octobre (0,25-1 mg/g PF). Cette évolution est semblable à celle observée par Esterbauer, Grill et Welt (1980), et par Dash et Jenness (1985), qui montrent des valeurs maximales à la fin de l'hiver et au début du printemps, et des valeurs minimales en automne. Ces variations du contenu en acide ascorbique pourraient être interprétées comme étant issues de l'activation ou de l'inhibition des processus d'anabolisme et de catabolisme. La température pourrait aussi jouer un rôle important, puisque le catabolisme de l'acide ascorbique diminue avec les températures basses et augmente avec les températures plus hautes. En hiver, le gel favoriserait l'accumulation de sucre dans les aiguilles, ce qui stimulerait alors la biosynthèse d'acide ascorbique (Franke, 1968).

Les polluants pourraient aussi jouer un rôle sur la teneur en acide ascorbique. De faibles concentrations de dioxyde de soufre en hiver auraient un effet stimulateur sur la photosynthèse, avec donc pour résultante une augmentation des sucres (Melhorn *et al.,* 1986). L'ozone aurait très probablement l'effet contraire, puisque en juin 1986, une chute importante d'acide ascorbique est simultanée à l'augmentation de la concentration d'ozone. La corrélation négative et significative entre la teneur en acide ascorbique cellulaire et l'évolution de l'ozone suggère que ce polluant a une influence dans la diminution de ce métabolite. Bien que les conifères aient une activité photosynthétique importante en automne (Keller et Hasler, 1984), donc favorable à la formation d'acide ascorbique, des taux élevés d'ozone expliqueraient la valeur minimale d'acide ascorbique en septembre.

Indicateurs

L'apparition de symptômes visibles (jaunissement) dans certaines aiguilles (1984) de la région ombragée de la couronne, pourrait être due à l'effet de l'ozone (Ashmore *et al.,* 1985; Skeffington et Roberts, 1985). Les dommages visibles pourraient être corrélés avec la teneur plus faible en acide ascorbique dans ces aiguilles, qui précède l'augmentation de la concentration d'ozone dans l'air. Les conditions défavorables pour la synthèse d'acide ascorbique, telles l'ombre ou la pollution photooxydante, empêcheraient la pleine efficacité des mécanismes de détoxication dans lesquels l'acide ascorbique serait impliqué.

L'activation des enzymes extracellulaires pourrait constituer une réponse à l'ozone ou à ses produits de dégradation dans l'espace extracellulaire. Ces enzymes, qui feraient partie des mécanismes de défense de la plante, joueraient un rôle dans le maintien d'un bon état sanitaire à des taux de pollution peu élevés. De ce point de vue, ces paramètres répondent encore de façon satisfaisante à la pollution atmosphérique (bonne capacité d'adaptation). Néanmoins, un seuil dangereux a pu être dépassé puisqu'un renversement de tendance est observé: les mécanismes de défense seraient alors débordés ou inhibés. Les moyennes mensuelles pour l'ozone en avril

et juillet 1986 atteignent des valeurs proches de 100 µg/m³. Cela veut dire que des épisodes de concentrations nettement plus élevées ont lieu assez souvent. Ces épisodes de courte durée sont plus dangereux pour les végétaux que ceux où l'on a des concentrations plus faibles pendant de longues périodes (Lefohn et Runeckles, 1987).

Des concentrations d'ozone similaires à celles mesurées à Genève en 1985 sont suffisamment élevées pour affecter négativement les écosystèmes forestiers (Miller *et al.*, 1982; Skeffington et Roberts, 1985). Si la charge à long terme tend à augmenter, le seuil critique pourrait être largement dépassé, ce qui provoquerait des conséquences très dangereuses pour l'état de santé des arbres selon leur sensibilité génétique. Ce concept de seuil a déjà été suggéré précédemment par Amiro *et al.* (1984) et Hogsett *et al.* (1985). D'après ces auteurs, un pic journalier de concentration élevée joue un rôle fondamental dans l'altération de la croissance. Ils ont aussi montré que la réduction de la croissance est bien corrélée à l'augmentation de l'accumulation d'ozone (concentration × temps).

Le froid est aussi un facteur dont il faut tenir compte. En effet, des périodes de fortes concentrations d'ozone en été, suivies de températures très froides en hiver pourraient affecter les mécanismes de défense de la cellule végétale. Une perte de vitalité des arbres, comme conséquence de la pollution par l'ozone en été, pourrait augmenter la sensibilité au gel (Bosch *et al.*, 1983; Brown *et al.*, 1987). Bien que les niveaux d'ozone mesurés à Genève soient proches de ceux observés en montagne (par exemple, 100 µg/m³ pendant la journée au mois de mai, à Garmisch, 740 m, aux Alpes Bavaroises), les températures minimales en hiver restent au-dessus de celles mesurées en montagne. Ceci pourrait expliquer l'absence de dommages importants dans la forêt genevoise malgré les taux relativement élevés d'ozone.

Conclusion

Nous pensons qu'il est fondamental d'étudier le comportement de paramètres biochimiques adéquats et de préciser s'ils sont utilisables pour la détection précoce des dommages invisibles causés aux arbres par les polluants atmosphériques dans un écosystème naturel. Cependant, la variabilité des systèmes naturels (la grande diversité génétique et l'intrication complexe des nombreux facteurs environnementaux) rend pour le moment l'interprétation des résultats assez difficile.

Des expériences complémentaires, en conditions contrôlées, sont donc nécessaires pour étudier l'impact des polluants atmosphériques sur les végétaux. Elles permettraient de distinguer les effets des différentes sortes de polluants afin d'établir un diagnostic différentiel précoce. Les chambres de fumigation semi-ouvertes facilitent la comparaison des symptômes des dommages et la croissance de plantes cultivées, soit en atmosphère ambiante, soit en atmosphère propre (air filtré) ou polluée (air filtré + polluants), et ceci dans un environnement qui s'approche pour de nombreux

paramètres de l'environnement naturel (Castillo *et al.,* 1987). Le calcul d'un indice d'exposition pour chaque polluant (valeurs cumulées), permettrait une comparaison empirique des résultats obtenus dans ces chambres avec d'autres obtenus dans un écosystème naturel.

Si la forêt genevoise est en bon état apparent, il n'empêche qu'elle subit les effets de la pollution comme nous les montrent les mesures biochimiques.

Les mécanismes de protection et d'adaptation aux polluants ont leurs limites. Les fluctuations répétées et importantes de certains polluants comme l'ozone, peuvent conduire à une modification de mécanismes biochimiques et physiologiques, selon les seuils de sensibilité. Ces événements peuvent amener, au fil de répétitions sur plusieurs années (histoire de l'arbre), un dérèglement adaptatif provoquant un syndrome du mal des forêts analogue aux autres régions de la Suisse, avec probablement une intensité moindre dans le ralentissement de la croissance et l'augmentation de la mortalité.

En concomitance aux mesures antipollution, dont les effets se font sentir progressivement, il pourrait être utile de planter des essences et des variétés plus résistantes aux polluants.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. E. Matthey de nous avoir communiqué des indications concernant la forêt de Versoix, les docteurs J.-Cl. Landry et F. Cupelin de nous avoir fourni les données de la pollution atmosphérique, ainsi que M. D. Voluntaru de son aide technique. Ce travail a été réalisé, en partie, avec l'appui financier du Fonds national suisse de la Recherche scientifique (4.849.0.85.14).

RÉFÉRENCES

AMIRO, B. D., T. J. GILLESPIE et G. W. THURTELL. Injury response of *Phaseolus vulgaris* to ozone flux density. *Atmos. Environ. 18,* 1207-1215, 1984.

ASHMORE, M., N. BELL et J. RUTTER. The role of ozone in forest damage in West Germany. *Ambio 14,* 81-87, 1985.

BEAUCHAMP, C. et I. FRIDOVICH. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal. Biochem. 44,* 276-287, 1974.

BLANK, L. W. A new type of forest decline in Germany. *Nature 314,* 311-314, 1985.

BOSCH, C., E. PFANNKUCH, U. BAUM et K. E. REHFUESS. Über die Erkrankung des Fichte (*Picea abies* L. [Karst]) in der Hocklagen des Bayerischen Waldes. *Forstwiss, Centralbl. 102,* 167-181, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem. 72,* 248-254, 1976.

BROWN, K. A., T. M. ROBERTS et L. W. BLANK. Interaction between ozone and cold sensitivity in Norway spruce: a factor contributing to the forest decline in central Europe? *New Phytol. 105,* 149-155, 1987.

CASTILLO, F. J. et H. GREPPIN. Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiol. Plant. 68,* 201-208, 1986.

CASTILLO, F. J., P. R. MILLER et H. GREPPIN. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia 43,* 111-115, 1987.

DASH, J. A. et R. JENNESS. Ascorbate content of foliage of eucalypts and conifers utilised by some Australian and North American mammals. *Experientia 41,* 952-955, 1985.

ELSTNER, E. F., W. OSSWALD et R. J. YOUNGMAN. Basic mecanisms of pigment bleaching and loss of structural resistance in spruce *(Picea abies)* needles: advances in phytochemical diagnosis. *Experientia 41,* 591-597, 1985.

ESTERBAUER, H., D. GRILL et R. WELT. Der jahreszeitliche Rhythmus des Ascorbinsäuresystems in Nadeln von *Picea abies. Z. Pflanzenphisiol.* Bd. 98, 393-402, 1980.

FRANKE, W. Der jahreszeitlich unterschiedliche Vitamin-C Gehalt in Coniferennadeln als Folge von Ascorbinsaüre biosynthese und — abbau. *Z. Pflanzenphysiol. 60,* 30-37, 1968.

GILLHAM, D. J. et A. D. DODGE. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves; seasonal variations. *Plant Science 50,* 105-109, 1987.

HEATH, R. L. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol. 31,* 395-431, 1980.

HINRICHSEN, D. Multiple pollutants and forest decline. *Ambio, XV,* 258-265, 1986.

HOGSETT, W. E., M. PLOCHER, V. WILDMAN, D. T. TINGEY et J. P. BENNET. Growth response of two varieties of slash pine seedlings to chronic ozone exposures. *Can. J. Bot. 63,* 2369-2376, 1985.

JOKINEN, J., R. KARJALAINEN, T. SÄYNÄTKARI, A. HÄKKINEN et K. MARKKANEN. Effects of air pollution on Scots pine needles. *Silva Fennica 17,* 279-287, 1983.

KATAINEN, H. S., R. KARJALAINEN, E. MÄKINEN, J. JOKINEN et S. KELLOMÄKI. Effects of SO_2 on photosynthesis and peroxidase activity in Scots pine needles. *Eur. J. For. Path. 14,* 33-42, 1984.

KELLER, T. et R. HÄSLER. The influence of a fall fumigation with ozone on the stomatal behavior of spruce and fir. *Oecologia 64,* 284-286, 1984.

KHAN, A. A. et S. S. MALHOTRA. Peroxidase activity as an indicator of SO_2 injury in Jack Pine and White Birch. *Biochem. Physiol. Pflanzen. 177,* 643-650, 1982.

LEFOHN, A. S. et V. C. RUNECKLESS. Establishing standards to protect vegetation — ozone exposure/dose considerations. *Atmospheric Environment 21,* 561-568, 1987.

MCLAUGHLIN, S. B., R. K. MCCONATHY, D. DUVICK et L. K. MANN. Effects of chronic air pollution stress on photosynthesis, carbon allocation and growth of white pine trees. *For. Sci. 28 (1),* 60-70, 1982.

MEHLHORN, H., G. SENFERT, A. SCHMIDT et K. J. KUNERT. Effect of SO_2 and O_3 on production of antioxidants in conifers. *Plant Physiol. 82,* 336-338, 1986.

MILLER, P. R., O. C. TAYLOR et R. G. WILHOUR. Oxidant air pollution effects on a western coniferous forest ecosystem. US Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Corvallis, OR. *EPA-600/D-82-276,* 1982.

OFFICE FÉDÉRAL DES FORÊTS ET DE LA PROTECTION DU PAYSAGE ET INSTITUT FÉDÉRAL DE RECHERCHES FORESTIÈRES. *Rapport Sanasilva* sur les dégâts aux forêts. Berne et Birmensdorf, novembre 1987.

PHILIPPE, J. Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie. *Masson et Cie.* 1967.

REITER, R. Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, *Materialien 28,* 1983.

SERVICE CANTONAL D'ECOTOXICOLOGIE. Mesure de la qualité de l'air 1985. *Genève,* avril 1986.

SCHÜTT, P. et E. B. COWLING. Waldsterben, a general decline of forests in central Europe: Symptoms, Development, and possible causes. *Plant Disease 69,* 548-558, 1985.

SKEFFINGTON, R. A. et T. M. ROBERTS. The effects of ozone and acid mist on Scots pine saplings. *Oecologia 65,* 201-206, 1985.

TANAKA, K. et K. SUGAHARA. Role of superoxide dismutase in the defense against SO_2 toxicity and induction of superoxide dismutase with SO_2 fumigation. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. Japan 11,* 155-164, 1980.