

UNIVERSITE DE LAUSANNE - FACULTE DES SCIENCES

Diplôme de biologiste

Développement d'un système biologique de
surveillance
de la pollution atmosphérique: études sur des
populations d'*Arabidopsis thaliana* sous
conditions
contrôlées

Mikhail CHAKHPARONIAN

Travail effectué sous la direction du
Prof J.-P. Zryd, Laboratoire de Phytogénétique Cellulaire

Lausanne, 1995

AVANT PROPOS

Ce travail a été soutenu par le Service de l'Environnement, de l'Hygiène et du Logement.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Pierre Zrýd pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour l'attention et la grande rigueur scientifique et linguistique avec lesquelles il a suivi mon travail.

J'exprime toute ma gratitude à Madame le Professeur Natalia Evgenievna Kroutchinina pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de diplôme à l'Université de Lausanne. Ses larges connaissances scientifiques, sa gentillesse et son attention envers mon travail m'ont été précieuses et indispensables tout au long de mes études.

J'exprime également mes plus vifs remerciements à l'égard de Madame le Professeur Nicole Galland pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie toute l'équipe du Service de l'Environnement, de l'Hygiène et du Logement pour leur collaboration: Docteur William Baehler pour ses conseils scientifiques, Monsieur Joël Rüetschi pour son aide irremplaçable, Monsieur Michel Wanner pour son aide technique importante. Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Mesdames Marie-Claude Pelet et Madeleine Wirth pour leurs conseils pratiques ainsi que pour la persévérance avec laquelle elles m'ont assisté durant ce travail.

J'ai été très heureux de pouvoir collaborer avec l'équipe du laboratoire de Phytogénétique Cellulaire qui ont rendu mon séjour à Lausanne très agréable et fructueux. Je remercie enfin le Docteur Véronique Besson qui m'a continuellement aidé pour perfectionner mon français et Maïa Zaïko pour l'analyse critique de mon travail.

Table des matières

1. Introduction	4
1.1 La pollution atmosphérique.....	4
1.2 Méthodes d'évaluation de la pollution atmosphérique.....	6
1.3 Réponse d'un système biologique à la pollution atmosphérique.....	7
1.3.1 Réponse d'un individu. Paramètres considérés.....	7
1.3.2 Réponse d'une population. Paramètres considérés.....	11
1.4 Tests statistiques.....	11
1.5 Choix d'un végétal.....	12
1.6 Conditions expérimentales.....	13
2. Matériel et méthodes	14
2.1 Arabidopsis thaliana.....	14
2.2 Dispositif expérimental.....	14
2.2.1 Principes et schémas.....	14
2.2.2 Expériences sur la conformité du dispositif expérimental.....	16
2.3 Expériences. Situation atmosphérique en ville de Lausanne.....	16
2.4 Analyses	19
2.4.1 Récolte et mesures biometriques.....	20
2.4.2 Dosages d'activités enzymatiques et de pigments.....	21
2.5 Etudes statistiques	22
3. Résultats	25
3.1 Expérience e1. (1.2.95-21.2.95).....	25
3.2 Expérience e2 (10.3.95 -30.3.95).....	27
3.3 Expérience e3. (4.4.95-24.4.95).....	28
3.4 Expérience e4 (11.4.95-30.4.95).....	30
3.5 Expérience e5 (23.5.95-13.6.95).....	32
3.6 Expérience e6 (6.6.95-27.6.95).....	34
3.7 Tendance saisonnière	36
3.8 Corrélations	40
4. Discussion	40
5. Conclusions	44
6. Bibliographie	45
7. Liste des abréviations	49

Cadre de travail

Dans les années 1960, une collaboration s'est instaurée entre l'Institut de biologie et de physiologie végétales de l'Université et le Service d'environnement, d'hygiène et de logement (SEHL) de la ville de Lausanne. L'objectif consistait alors à déterminer les niveaux de pollution de l'air en ville et leurs effets sur quelques systèmes biologiques. La collaboration s'est poursuivie avec le Laboratoire de phytogénétique cellulaire et porte actuellement sur la mise au point et application éventuelle d'un système expérimental destiné à préciser l'effet de la pollution atmosphérique sur un végétal individuel et sur l'ensemble d'une population végétale.

Cette recherche est placée dans la perspective de l'article 8 de la Loi fédérale sur la protection de l'environnement, qui prévoit que les atteintes seront évaluées isolément, collectivement et dans leur action conjointe. Dans le cas présent, l'évaluation porte sur l'effet collectif des divers polluants atmosphériques présents dans l'air de la ville de Lausanne. En outre, les résultats de cette recherche complètent les informations apportées par les observations des forêts et par le réseau de mesure de la pollution atmosphérique installé dans l'agglomération lausannoise.

1. Introduction.

L'objectif de la recherche consistant à mesurer l'effet global de la pollution atmosphérique sur un végétal, et surtout, sur une population de végétaux, il est nécessaire de répondre en préambule aux questions qui suivent :

Comment définit-on la pollution atmosphérique ?

Quelles méthodes d'évaluation de pollution atmosphérique existent déjà ?

La surveillance biologique se substitue-t-elle à ces méthodes ou les complète-t-elle ?

Quels sont les paramètres biologiques à étudier ?

Quel végétal va-t-on utiliser ?

Quelle approche statistique doit-on choisir, et quelles sont les conditions expérimentales qui s'y conforment ?

1.1 La pollution atmosphérique

Quand l'air est-il pollué ? On peut dire qu'il l'est quand "ses usages sont détériorés" [Treshow et Anderson 1989]. En d'autres termes, la pollution atmosphérique correspond à toute modification indésirable de la composition d'air.

L'atmosphère urbaine est constituée d'un grand nombre de composés chimiques dont les concentrations varient individuellement au cours du temps. Les composés « majeurs » comme l'oxygène et l'azote sont toujours présents en concentrations assez stables et, avec les gaz inertes comme l'argon, ils ne font pas l'objet d'études sur la pollution atmosphérique. Par contre, d'autres composés, inoffensifs en quantités

mineures, constituent un grand problème s'ils sont introduits en quantités importantes dans l'atmosphère au cours de processus naturels (comme éruptions de volcans) ou du fait des activités humaines. Ces derniers sont actuellement (cf. paragraphe 2.3) [Bremer et al. 1992, Baehler 1987] :

- Les oxydes d'azote NO_x , soit un mélange de monoxyde d'azote NO et de dioxyde d'azote NO_2 . A l'émission, le NO domine, mais il se transforme progressivement en NO_2 dans l'atmosphère, la source principale étant les véhicules à moteur.
- Le dioxyde de soufre SO_2 , principalement émis par les installations de chauffage et de production d'énergie.
- Le monoxyde de carbone CO dont les transports sont la source principale.
- Les composés organiques volatils, COV, comportant une grande variété d'hydrocarbures. Les sources sont principalement industrielles.
- Les poussières et suies.
- Les métaux lourds

Par ailleurs, la combustion du pétrole et de ses dérivés, du charbon et du bois, aboutit à la production de gaz carbonique CO_2 en quantités nettement supérieures à celles des autres polluants cités. Ce gaz n'est que faiblement toxique mais il contribue à l'effet de serre, modifiant par là le climat.

Ces polluants primaires, notamment les NO_x et les COV, réagissent entre eux sous l'effet du soleil, conduisant à la formation d' O_3 . Ce dernier est vital dans la stratosphère où il protège la surface de la terre des rayons U.V. ; dans la troposphère, il représente un polluant secondaire particulièrement nocif.

Depuis longtemps on connaît les effets néfastes des polluants atmosphériques. L'ouvrage classique de John Evelyn, daté de 1661, "*Fumifugium, or the Inconvenience of the Aer and Smoake of London Dissipated*" inclut déjà les observations montrant que "la fumée" tue nos abeilles et nos fleurs, empêche tout ce qui est dans nos jardins de bourgeonner ... ou mûrir " [cité dans Treshow et Anderson 1989]. Aujourd'hui des recherches plus précises démontrent comment la santé humaine, les espèces animales et végétales (cf. paragraphe 1.3.1) sont affectées à partir de certaines doses limites. Toutefois, les conclusions sur les quantités de polluants qui entraînent des effets nocifs sur les végétaux ou les animaux restent évasives. La notion de la « valeur limite » est fort contestable. De plus, il existe le problème de la justification des concentrations des polluants qui ne sont pas anthropogènes, ou bien de la « pollution de fond » qui est indépendante des sources locales. Cela nous rappelle que l'on ne peut pas revenir à un « état initial », qui est de toute façon très difficile à préciser. Cependant, on peut définir certaines limites. L'Organisation Mondiale de la Santé a émis des recommandations basées sur un bilan des recherches épidémiologiques et toxicologiques dont les pays s'inspirent pour l'établissement de leurs normes. C'est en 1985 que le Conseil Fédéral a édicté les valeurs limites d'immissions dans l'Ordonnance sur la protection de l'air pour NO_2 , SO_2 , CO, O_3 , poussières et métaux lourds.

Il est d'ailleurs illusoire de penser que seules les concentrations trop élevées contribuent à la pollution atmosphérique proprement dite. Quand un smog épais couvre la vue ou qu'une saveur âcre sulfureuse irrite la gorge, il est évident que "les usages de l'air sont détériorés", il est néanmoins très difficile de quantifier la diminution de récoltes ou le dépérissement insidieux des forêts dus à la pollution atmosphérique puisque ce sont des processus longs qui peuvent passer inaperçus. Dans les années 1950, les scientifiques des pays ont fait remarquer que des plantes exposées à des niveaux élevés de fluor, dioxyde de soufre ainsi que d'azote, de chlore etc. présentaient des symptômes manifestes tels que nécroses, brûlures, chloroses etc.(cf. paragraphe 1.3.1). A l'époque, de tels cas étaient fréquents. Maintenant ceux-ci sont des cas extrêmes, qui n'intéressent plus les chercheurs. En revanche, l'intérêt porte sur les concentrations de fond qui affectent les organismes à long terme.

1.2 Méthodes d'évaluation de la pollution atmosphérique

Il existe de nombreux appareils de mesure de concentrations des polluants gazeux. Leur variété permet de mesurer les concentrations momentanées ou les doses cumulatives. La majorité d'entre eux se base sur des méthodes physico-chimiques : mesures spectrométriques directes ou échantillonnage passif qui fonctionne sur le principe de la diffusion de la substance dans un milieu absorbant. Le matériel spectroscopique utilisé étant coûteux, il est difficile de multiplier les points de mesures momentanées. En revanche, les capteurs passifs sont moins chers et il est possible de les installer partout, mais leur utilisation est actuellement restreinte à NO₂ et O₃. L'information qu'ils donnent sur la dose totale en fonction d'un temps d'exposition limité peut être insuffisante pour ceux qui s'intéressent aux variations journalières. De surcroît, toutes ces techniques de mesures ne sont faites que pour les polluants majeurs ; les techniques de mesures de polluants mineurs ou occasionnels n'étant que peu développées, leur application pour le contrôle courant est réduite. De plus, il n'est jamais suffisant de connaître les concentrations de chaque polluant car leur effet sur les êtres vivants peut ne pas être simplement additif. Les méthodes physico-chimiques ne permettent pas d'estimer les effets cumulés dans le temps ni les effets synergiques ou antagoniques de plusieurs polluants lorsque les concentrations de chacun d'eux sont connues. Etant conscients de ces problèmes, les chercheurs se tournent vers les organismes vivants dont l'observation peut apporter les informations complémentaires.

Un des exemples les plus parlants est l'utilisation des lichens comme « bioindicateurs » - marqueurs de la pollution atmosphérique. Ces organismes complexes, qui présentent une symbiose entre les champignons et les algues, sont très sensibles à toute détérioration de l'air. Le « biomonitoring » passif avec les lichens permet de formuler des conclusions qualitatives et quantitatives quant au type et à la quantité d'importants polluants [Arb et Brunold 1990, Arb et al. 1990, Urech et al. 1992]. Les données sur la diversité, la distribution et l'état physiologique des lichens sont répertoriées sous forme de cartes ou de cadastres permettant un suivi des tendances de la qualité de l'air. Ceci a été fait pour certaines régions en Suisse (Biel-Seeland).

Afin d'évaluer la pollution atmosphérique due à un polluant déterminé, plusieurs systèmes biologiques ont été proposés. Le principe de ces recherches consiste à choisir un organisme particulièrement sensible à ce polluant; la réaction spécifique (cf.

paragraphe suivant) de cet organisme peut être corrélée à la concentration du composé. Dans le cas où la réaction spécifique n'est pas présente, la réponse de l'organisme peut traduire l'effet de la pollution atmosphérique totale.

Par exemple, la réaction de l'appareil photosynthétique à la pollution atmosphérique est largement connue. Cette réaction se manifeste soit sous forme de changements des concentrations des pigments soit d'une diminution de l'efficacité de la photosynthèse. Cette dernière peut être estimée par l'analyse de la fluorescence de chlorophylle (effet de Kautski). Plus le système photosynthétique est endommagé, plus grande est l'énergie émise sous forme de fluorescence. De nombreux appareils de mesure ont été construits pour étudier cette réaction *in vitro* ou *in situ*. Leur application aux plantes d'une région ou aux algues d'un lac permet d'établir le niveau de contamination local de l'air ou de l'eau.

D'autre part, la pollution atmosphérique n'agit pas seule. D'autres facteurs environnementaux comme la température, la lumière ou l'humidité ayant une action sur le développement des organismes peuvent compliquer l'interprétation de la réponse. Pour éliminer l'influence de ces facteurs il est donc possible de

- recueillir les données pendant plusieurs années pour établir la variation de la réponse due à la variation des conditions ;
- contrôler les conditions ce qui permet d'attribuer les variations de la réponse uniquement à la pollution atmosphérique.

1.3 Réponse d'un système biologique à la pollution atmosphérique

Pour comprendre quelle est la réponse d'un système biologique à la pollution, il faut analyser son effet sur le comportement d'un individu et d'une population entière. Notre travail porte sur les végétaux. En général, pour corréler les effets observés avec la pollution atmosphérique, on étudie plusieurs échantillons de plantes dont un - les plantes témoins - ne subit aucun stress de la pollution atmosphérique. Cet échantillon est exposé à l'air filtré ou synthétique ne comportant aucun polluant. Selon l'objectif de la recherche, les échantillons « traités » sont exposés à l'air ambiant et/ou à des concentrations diverses du polluant dont l'effet est étudié (cf. paragraphe 1.6).

1.3.1 Réponse d'un individu. Paramètres considérés.

L'action des polluants sur les végétaux a été constatée il y a de nombreuses années ; les soucis se sont accentués dans les années 50-60. Les symptômes classiques comme lésions nécrotiques, chloroses, brunissement des feuilles se sont avérés dus aux composés homologues de peroxyacétyl nitrate (PAN), et ensuite à l'ozone. Dans les années 70-80, l'inquiétude générale s'est portée sur l'oxyde de soufre et les pluies acides. Il a fallu plusieurs décennies pour préciser les effets des polluants majeurs sur les végétaux et en comprendre les mécanismes [Treshow et Anderson 1989].

Pour la plupart des polluants les symptômes visibles de leurs effets comprennent

- une diminution de la croissance et des poids frais et sec [Braun et Flückiger 1995, Woodbury et al. 1994]

- des changements morphologiques (rapport « tiges/racines », distances internodales etc.) [Arb et Brunold 1990, Casano et al. 1994, Woodbury et al. 1994]
- une diminution de la production et de la viabilité de graines [Janakiraman et al. 1975, Scotti et al. 1994]
- des nécroses et des chloroses [Braun et Flückiger 1995]
- des altérations de la pigmentation [Arb et al. 1990, Knudson et al. 1977]

Aux niveau biochimique on observe

- des changements d'activité de certaines enzymes (peroxydases, superoxyde dismutase(SOD), glutathion réductase(GR), glutathion S-transférase(GST), phénylalanine ammonia-lyase(PAL), etc.) [Bender et al. 1994, Bowler et al. 1992, Castillo 1992, Treshow et Anderson 1989, Schulte-Hostede et al. 1988]
- des changements de taux des chlorophylles et d'autres pigments (zéaxanthine, violaxanthine etc.) [Knudson et al. 1977, Wingsle et al. 1992]
- des changements de concentrations de certains composés (glutathion, ascorbate, phytol, acides aminés etc.) [Bender et al. 1994, Ekeberg et al. 1995, Holopainen 1994, May et Leaver 1993]
- des perturbations membranaires, et des changements de concentrations d'ions calcium, potassium et sodium [Scotti et al. 1994].

Bien qu'il soit difficile de généraliser la façon dont les divers polluants interfèrent avec les processus métaboliques, il existe entre eux plusieurs points communs. Tous les polluants gazeux pénètrent par les stomates vers les espaces intercellulaires. Il est connu qu'ils peuvent changer la conductance stomatale directement en affectant les cellules de gardes ce qui altère la photosynthèse. D'autre part, leur effet direct sur la photosynthèse (cf. ci-dessous) peut conduire à des perturbations du contrôle de conductance stomatale par l'effet de rétroaction du CO₂. En général, les résultats des expériences visant à établir l'effet des polluants sur la conductance stomatale sont contradictoires justement à cause de l'interaction de ces deux voies d'impact. Après pénétration, les polluants agissent sous forme radicalaire plutôt que sous leur forme native. Ils peuvent se dissoudre dans l'eau de surface des cellules, en affectant par là le pH cellulaire, et réagir avec les parois des cellules du mésophylle. En fait, la paroi polysaccharidique étant relativement inerte, l'élément le plus touché reste la membrane cellulaire et notamment les protéines intermembranaires. Les effets ne sont pas limités à la membrane cytoplasmique, mais atteignent aussi les organites cellulaires, dont les chloroplastes qui sont les plus frappés. La membrane thylakoïdienne est, visiblement, la plus sensible. Les conséquences les plus désastreuses pour la plante sont les changements irréversibles des enzymes, des protéines et, surtout, de l'ultrastructure des organites cellulaires entraînant la désorganisation de l'appareil photosynthétique. Tous les autres processus métaboliques sont également détériorés ce qui conduit à l'endommagement de la plante, même si symptômes ne sont pas apparents.

L'ozone et les oxydes d'azote étant les polluants les plus importants à Lausanne (cf. paragraphe 2.3), la connaissance de leurs effets spécifiques sur la végétation serait utile.

L'ozone, étant un composé hautement réactif, crée un stress oxydatif. Dissous dans l'eau de surface des cellules, il se décompose rapidement, produisant les radicaux libres HO_2^- , HO^+ , OH^- , O^- et HO_2^- qui oxydent des métabolites cellulaires et affectent les constituants de la membrane tels que les groupes sulfhydriques SH des acides aminés et les acides gras nonsaturés. Les radicaux non-neutralisés modifient la structure moléculaire de plusieurs enzymes. L'ozone passe ensuite par la paroi cellulaire en agissant sur les chaînes polypeptidiques des bi-couches lipidiques et surtout sur les cystéines et les méthionines des protéines de la membrane. De la même façon, il endommage les membranes des organites, particulièrement celles du réticulum endoplasmique et des chloroplastes. Il est très difficile de dire à quel point l'ozone interfère avec les processus photosynthétiques, mais les étapes probablement les plus facilement inhibées sont le transport d'électrons entre les photosystèmes et les réactions de formation de sucres du cycles de Benson et Calvin. Il est à souligner que plusieurs voies métaboliques sont atteintes par l'inhibition des enzymes provoquée par l'oxydation des groupes sulfhydriques par l'ozone [Treshow et Anderson 1989, Schulte-Hostede et al. 1988]. Aux niveau de la transcription, il est démontré pour *Nicotiana tabacum*. que l'ozone provoque une réduction du niveau d'ARNm des gènes codant pour la petite sous-unité de ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, la protéine de liaison de chlorophylle et une protéine du complexe du photosystème II [Bahl et Kahl 1995].

Les plantes possèdent des systèmes de protection contre les radicaux libres ainsi introduits dans les cellules. Ils peuvent impliquer une enzyme qui catalyse l'oxydation d'un substrat par ces radicaux. Par exemple, la superoxyde dismutase conduit à la transformation des radicaux superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est éliminé par la catalase et/ou au cours de l'oxydation de l'ascorbate par l'ascorbate peroxydase (APx) et au cours de l'oxydation du glutathion par la glutathion peroxydase (GPx). Halliwell et Asada ont proposé un mécanisme d'élimination de H_2O_2 [Bowler et al. 1992](Figure 1.).

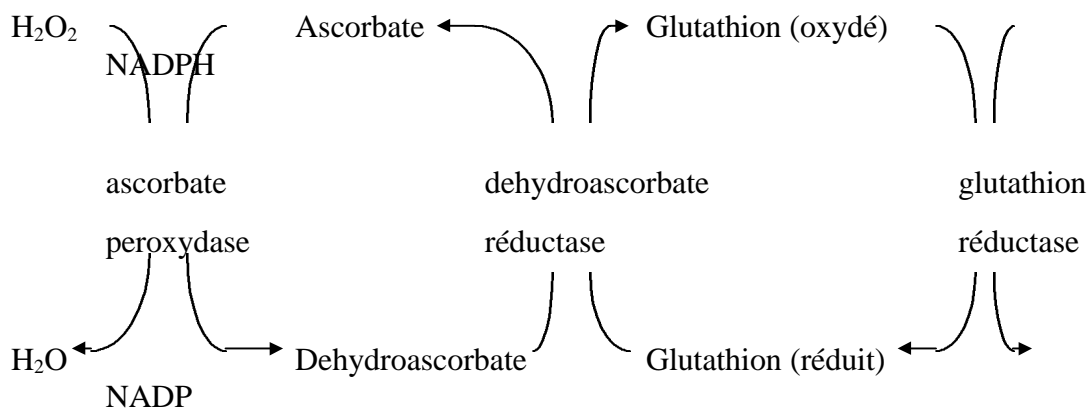


Figure 1. La voie de Halliwell-Asada

La sécrétion de peroxydases, par exemple, peut être induite par une concentration élevée de Ca^{++} cytoplasmique dont le transport est affecté par le stress oxydatif [Schulte-Hostede et al. 1988]. En outre, les expériences avec *Arabidopsis thaliana* ont

démontré que des concentrations élevées d'ozone peuvent sensiblement augmenter le niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes PAL, GST, SOD et peroxydases [Sharma et Davis 1994]. L'ozone augmente sensiblement l'expression des gènes codant pour la GPx et pour une des catalases chez *Nicotiana plumbaginifolia*, même avant l'apparition de dégâts visibles, tandis que l'induction de la SOD et de la APx cytosolique a lieu seulement après leur apparition [Willekens et al. 1994]. Les expériences avec *Nicotiana tabacum* ont également démontré une augmentation d'expression à l'état stationnaire des gènes codant pour PAL, chalcone synthase, chitinase et β -1,3-glucanase après une fumigation avec des gaz d'échappement et de l'ozone en concentrations subnécrotiques, similaire à celle induite par des blessures ou des attaques de pathogènes [Bahl et al. 1995]. Pourtant, certains scientifiques estiment que les peroxydases sont trop sensibles au stress oxydatif pour être de bons marqueurs de la pollution atmosphérique [Castillo 1992], bien que leur manque de spécificité puisse en faire de bons marqueurs de la pollution atmosphérique globale. Il s'y ajoute une certaine incertitude due aux différences substantielles de réponse entre les espèces et même entre les réponses de la même espèce aux diverses concentrations.

Les oxydes d'azote seuls et surtout NO sont moins toxiques pour les plantes. On suppose que NO₂ est responsable de l'augmentation des concentrations de chlorophylles dans les lichens soumis à l'air urbain pollué [Arb et Brunold 1990, Arb et al. 1990]. Par contre, la formation de NO₃⁻ et de NO₂⁻ dans les tissus foliaires après fumigation avec NO₂ inhibe la fixation photosynthétique de CO₂. On suppose que le NO₂⁻ formé interfère avec le transport d'électrons et/ou acidifie le stroma ce qui conduit à l'inhibition de certaines enzymes [Schulte-Hostede et al. 1988]. Des changements de concentrations d'acides aminés et des modifications de leur rapport respectif dans les tissus foliaires provoqués par la fumigation avec les oxydes d'azote ont été également constatés. Ces événements sont souvent accompagnés d'une augmentation de l'activité des nitrate et nitrite réductases, de la glutamate synthétase et de la glutamate dehydrogénase [Schulte-Hostede et al. 1988]. Les expériences citées plus haut témoignent également que les oxydes d'azote sont probablement peu impliqués dans l'induction des enzymes de défense [Bahl et al. 1995].

En outre, l'effet synergique des oxydes d'azote et de l'ozone est plus qu'additif et entraîne de sérieuses lésions et une diminution de la surface foliaire. Par contre, les expériences avec *Zea mays* suggèrent un effet antagonique des oxydes d'azote et de l'oxyde de soufre. En général, l'ensemble de ces polluants manifeste une action synergique. Les dégâts visibles peuvent apparaître sous leur effet synergique lorsque chacun d'entre eux n'entraîne aucun symptôme même à des concentrations plus élevées. [Treshow et Anderson 1989].

Il est également important de se rendre compte de l'interaction entre les polluants et l'humidité, la lumière et la nutrition des plantes. Les conditions sèches, par exemple, provoquent la fermeture des stomates et l'exposition aux polluants diminue. D'un autre côté, les taux d'humidité supérieurs à 90% réduisent la sensibilité à l'ozone. Les résultats des études sur l'interaction entre la nutrition et la pollution atmosphérique sont plus complexes et souvent contradictoires. Quant à la luminosité, il est connu que pour certains polluants une sensibilité plus importante au stress a été constatée pour les plantes exposées à une journée plus courte ou à une luminosité élevée.

De même, les stress biotiques peuvent interagir avec la pollution atmosphérique ce qui produit fréquemment des dommages plus prononcés que ceux dus au stress de la pollution atmosphérique seule [Treshow et Anderson 1989]. Il est à noter que les plantes exposées à la pollution atmosphérique sont plus sensibles aux attaques de pathogènes ce qui peut aussi représenter un bon marqueur de la pollution.

Le choix des paramètres qui pourraient traduire un effet de la pollution atmosphérique globale sur un végétale doit alors se fonder sur les critères suivants :

- non spécificité à un polluant particulier
- sensibilité à une vaste gamme des polluants
- facilité de mesures qui doivent être reproductibles, fiables, peu coûteuses.

Tenant compte de toutes ces considérations, les paramètres retenus pour notre étude sont les paramètres biométriques (la longueur de la feuille maximale, la surface foliaire, poids sec et/ou frais etc.), la concentration totale de protéines solubles, l'activité de peroxydases, de la glutathion réductase et la teneur en chlorophylles a, b. Nous avons d'autre part tenté d'étudier la cinétique de la croissance et de la montaison des plantes.

1.3.2 Réponse d'une population. Paramètres considérés.

Pour assurer la fiabilité des résultats, les mesures sont généralement effectuées sur un nombre suffisant de plantes. Ensuite, l'étude porte sur les moyennes des paramètres mesurés pour plusieurs traitements (pour les études sur la pollution atmosphérique, on analyse un échantillon des plantes témoins et plusieurs échantillons des plantes exposées à la pollution, cf. paragraphe 1.3 et 1.6.) A l'aide de tests statistiques divers, les moyennes sont comparées et la conclusion sur l'effet de la pollution peut être prononcée.

Il existe pourtant certaines raisons de supposer que la moyenne seule ne peut pas pleinement traduire l'effet de la pollution. La liaison entre la pression sélective et la variabilité génétique implique un rôle important des modifications de la structure de la population comme une réponse à n'importe quel stress, y compris celui de la pollution atmosphérique. Par exemple il est possible qu'un facteur de stress puisse augmenter la production de la biomasse d'une partie des plantes (i.e. certaines plantes peuvent utiliser SO₂ pour la nutrition en soufre) et la réduire chez les autres (SO₂ peut réduire la capacité compétitive de certaines plantes) [Coleman et Mooney 1994]. Dans ce cas-là il y n'aura plus d'effet significatif sur la production de la biomasse moyenne ; en revanche, un effet important se fera sur la *variabilité* parmi les plantes. Cette variabilité élevée pourrait conduire à d'importants changements de la structure génétique de cette population. En effet, les plantes d'une biomasse supérieure (et par conséquent d'une efficacité de reproduction supérieure) pourront contribuer de façon plus importante au matériel génétique des générations suivantes qu'elles ne le pourraient en absence du stress. Pour cette raison, une étude sur la structure de la population donnera des informations plus complètes. Il est préférable d'analyser les réactions « de populations de plantes, qui n'ayant jamais été soumises aux effets de la pollution atmosphérique manifestent, dès qu'elles sont mises en contact avec une atmosphère polluée, des modifications de la variabilité phénotypique » (Zrýd 1993).

La structure de la population peut être caractérisée par les paramètres:

- la moyenne, la médiane, le mode qui situent l'ensemble de la population, représentant ainsi des mesures de la *tendance centrale*
- la variance, l'écart type, le coefficient de variation qui sont des mesures de la *variabilité*, ou de la *dispersion*
- kurtosis et le degré d'asymétrie (les moments du 3^e et du 4^e ordres, ainsi que des ordres plus élevés) qui sont des mesures de la *distribution*

Il est donc nécessaire d'analyser non seulement la différence de la tendance centrale mais aussi la différence de la variabilité entre les plantes traitées et témoins. Une analyse de la distribution pourrait apporter des informations complémentaires et sera aussi présentée.

1.4 Tests statistiques.

La population ayant généralement un effectif infini, les mesures portent sur un échantillon aléatoire de cette population. Il s'agit alors des mêmes paramètres, mais dits *empiriques* pour indiquer qu'ils sont calculés sur un échantillon de la population. Il est à souligner que l'extraction d'un échantillon doit être faite absolument au hasard.

Comme il a été signalé, les tests statistiques imposent les conditions expérimentales où il y a un échantillon soumis à un traitement et un autre, témoin. Tous les tests statistiques vérifient l'hypothèse dite « nulle » (H_0) qui postule qu'il n'existe aucune différence entre les populations dont les échantillons sont extraits. Une statistique (ou une valeur statistique) est calculée à partir des données sur l'échantillon. Ensuite en fonction de cette statistique et de l'effectif de l'échantillon on calcule une probabilité, p , que l'hypothèse nulle soit véridique. Il est convenu d'estimer qu'une valeur de $p < 0.05$ est assez significative pour rejeter l' H_0 et accepter l'hypothèse alternative (H_a) qui postule qu'il existe une différence entre les populations. Si le calcul de la statistique du test se base sur les paramètres comme la moyenne ou la variance, le test est dit « paramétrique ». Ces tests ont souvent plusieurs suppositions restrictives sur ces paramètres et la structure de la population. Si la statistique du test n'est pas calculée à partir des paramètres de la population, il est « nonparamétrique ». Les tests nonparamétriques sont préférables dans tous les cas où les suppositions du test paramétrique sont remises en question.

Pour la comparaison de la tendance centrale de deux échantillons le test le plus utilisé est le test T, basé sur la moyenne. Pour la variabilité, le test ordinaire est le test F, basé sur la variance. Or, le test T suppose que les variances des deux échantillons sont égales, ce qui est en contradiction avec nos expériences qui visent justement à démontrer l'inverse. De plus, les deux tests sont fortement influencés par des déviations de la distribution normale des échantillons. Ils ne sont donc pas appropriés à notre étude.

Deux autres tests sont alors proposés : un test nonparamétrique de Mann-Whitney (test U) et le test de Levene qui est paramétrique mais faiblement sensible à la non-normalité d'échantillons. Pour l'analyse de la distribution des populations, le test W de Shapiro et Wilk sera appliqué aux échantillons pour vérifier leur normalité. Les valeurs du degré d'asymétrie vont être également discutées.

Il est important de noter que plus l'effectif des échantillons étudiés est grand, plus la sensibilité (capacité de distinguer la différence entre les échantillons) et la robustesse (résistance aux erreurs du type I et II¹) sont élevées.

1.5 Choix d'un végétal.

Le choix d'un végétal doit tenir compte des considérations suivantes :

- Un nombre important de plantes, imposé par les tests statistiques, et des limitations raisonnables d'espace favorisent une plante d'une petite taille
- Une étude à différents stades de développement dans un laps de temps raisonnable serait possible surtout avec une plante annuelle, à cycle de vie relativement court
- La plante ne doit pas être particulièrement sensible à un polluant ; ainsi sa réaction traduira non pas l'effet spécifique de ce polluant, mais celui de la pollution atmosphérique totale
- La plante doit être robuste et peu susceptible à l'action des pathogènes pour que ceux-ci n'interfèrent pas à la réaction à la pollution atmosphérique (cf. paragraphe 1.3.1)
- L'utilisation d'une espèce indigène pose moins de problèmes d'adaptation et permet d'envisager une étude complémentaire sur le terrain.

Arabidopsis thaliana a répondu à ces critères de choix. De surcroît, cette plante est couramment utilisée dans la recherche génétique et sa méthodologie est très développée.

1.6 Conditions expérimentales.

Ici, on peut résumer les exigences des conditions expérimentales appropriées à ce genre d'étude :

- Pour corrélérer la réaction des plantes uniquement à la pollution atmosphérique tous les paramètres autres que la composition de l'air doivent être contrôlés.
- Il est nécessaire de travailler avec deux incubateurs en parallèle : l'un recevant de l'air filtré (témoin), l'autre recevant de l'air non-filtré (traité). Pour obtenir une fiabilité des résultats il est souhaitable d'avoir plusieurs incubateurs par traitement.
- Un nombre important de plantes étant essentiel, il faut optimiser la disposition des plantes dans les incubateurs sans qu'elle subissent un stress dû au manque d'espace.

¹L'erreur du type I est commise si l' H_0 est rejetée tandis qu'elle est véridique; l'erreur du type II est commise si l' H_0 n'est pas rejetée tandis qu'elle est fausse.

- Le matériel du dispositif doit être inerte pour assurer que l'air non-filtré ne change pas de composition à son contact. Il est donc important de connaître la composition de l'air sur le site de l'expérience et dans les incubateurs.

2. Matériel et méthodes.

2.1 Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana est une plante annuelle dont le cycle de développement dure moins de 2 mois. C'est une *Brassicacée*, son génome comprend $2n=10$ chromosomes qui sont dans leur ensemble cartographiés. Elle est autoféconde et il est très facile d'obtenir des graines en phytoclimatiseur. Une plante porte au moins 50 siliques dont chacune contient au moins 50 graines lorsqu'elle se développe dans de bonnes conditions. On peut donc obtenir au minimum 2500 graines par plante, soit 250 mg de graines.

Les graines d'*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0, ont été obtenues chez *Nottingham Arabidopsis stock centre*. Pour maintenir le stock de graines, les plantes sont cultivées en phytoclimatiseur en conditions de croissance contrôlées. Les siliques sont récoltées et les graines sont stockées dans un endroit sec et frais.

Différents essais ont montré qu'elle se développe bien sur du terreau à cactus, ainsi que sur des milieux artificiels, alimentée d'une solution nutritive. Les plantes sont alors semées sur le terreau à cactus (Migros) dans des bacs percés au fond pour permettre l'alimentation en solution nutritive par diffusion. Les bacs de croissance contiennent une couche de terreau de 3-4 cm où 50 plantes pour 3 semaines d'exposition ou 10-25 plantes pour 6 semaines d'exposition sont semées.

Les graines étant petites, elles sont incluses dans l'agar à 0.15-0.30% avant d'être semées une à une à l'aide d'une pipette Pasteur pour bien gérer leur répartition. Les bacs de croissance sont placés environ 48 heures à 4°C, à l'obscurité afin de lever la dormance des graines et de les hydrater ce qui rend leur croissance plus homogène avec un taux de germination de 95 à 100%. Les bacs sont ensuite transférés dans un phytoclimatiseur pour 5 jours en condition de température, lumière, composition d'air et humidité relative contrôlées. Pendant la période d'éclairement de 16 heures, la température est fixée à 24°C et 18°C durant les 8 heures de nuit. L'humidité est maintenue à environ 70%. L'intensité de lumière varie dans le phytoclimatiseur entre 67 et 76 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en fonction de la position. Les bacs sont ensuite placés dans les incubateurs mobiles pour l'exposition.

2.2 Dispositif expérimental

Le modèle du dispositif utilisé dans ce travail a été mis au point en collaboration avec le SEHL.

2.2.1 Principes et schémas

Les dimensions des incubateurs mobiles étant de 55 cm de longueur, de 40 cm de largeur et de 40 cm de hauteur, le volume de l'incubateur est de 88 litres.

Les parois et le couvercle sont en verre d'une épaisseur de 6 mm. Les parois sont jointes à l'aide de cornières et de vis en acier inox et étanchéifiées à l'aide de feuilles de Téflon d'une épaisseur de 0.1 mm. Le double fond est en Anticorodal étanchéifié de caoutchouc et l'eau peut circuler dans un espace de 8 mm entre les deux plaques. La surface exposée à l'air dans l'incubateur est couverte d'une feuille en Téflon. Plusieurs

trous sont percés dans le couvercle pour l'arrosage, l'entrée et la sortie de l'air. La quantité de lumière naturelle mesurée dans un incubateur diminue mais le flux lumineux reste suffisant pour le développement des plantes.

Lors des expériences à la place Chauderon, deux incubateurs ont été utilisés par traitement. Chacun peut comporter 1 ou 2 bacs de croissance. La prise d'air commune se situe sur le toit du bâtiment administratif à l'altitude d'environ 550m (6^e étage, côté nord). Pour tous les incubateurs, l'air passe tout d'abord par des filtres à poussière en Téflon (Figure 3). Les incubateurs contenant les plantes traitées reçoivent l'air sans autre filtration. Les incubateurs contenant les plantes témoins reçoivent l'air après passage au travers d'un préfiltre constitué d'une cartouche en verre remplie de Kieselgur imprégné de permanganate de potassium puis d'un flacon laveur à gaz rempli de charbon actif. Avant d'être injecté dans les incubateurs l'air passe encore par un filtre à poussière en papier. Un débit de 8-9 l/min. est assuré par plusieurs pompes disposées de telle façon que l'air non-filtré ne passe qu'à travers la pompe dont la tête est entièrement en Téflon. Toutes les surfaces en contact avec l'air ambiant (non-filtré) doivent être inertes : en Téflon (pour toute la tuyauterie, les joints, le fond des incubateurs, les filtres à poussière, les composants de la pompe), en verre (pour les parois et le couvercle des incubateurs) ou en acier inox (pour certains raccords, les vis tenant les parois des incubateurs).

L'éclairage se fait par 3 rampes lumineuses par incubateur (une sur le couvercle et une sur chaque grand côté) et la photopériode est fixée à 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Les parois sont recouvertes d'aluminium à l'extérieur pour limiter la diffusion de la lumière.

La température est contrôlée par des thermomètres dont les sondes sont dans la terre des bacs de croissances et à environ 10 cm du niveau de la terre. Pour la période février - mai, elle restait entre 16°C (la nuit) et 24°C (le jour). Aucune différence de température entre les incubateurs n'a été constatée. Il en va de même pour la période mai - août bien que les fluctuations de température au cours de la journée soient plus importantes. Celles-ci ont pu être réduites de 19-29°C à 17-23°C à l'aide d'un cryothermostat en régime de refroidissement. Il était cependant impossible d'éviter qu'un certain gradient de température se crée entre l'air frais chaud et les plantes.

La qualité et la quantité de lumière se sont avérées peu homogènes dans l'incubateur mais suffisantes pour le développement des plantes.

Les données techniques du matériel utilisé sont les suivantes :

- pompe à membrane KNF de type N 026 ATE, 220 v, 50 Hz, n°00346, débit maximum de 20 l/min. réglable
- pompe à membrane KNF de type N 726.3 FT.18, 220 v, 50 Hz, à deux têtes, débit maximum de 32 l/min.
- thermomètres mini/maxi de Bioblock Scientific n°45220
- tuyaux en Téflon de diamètre 6 et 10 mm
- cryothermostat avec pompe pour la circulation de l'eau à 15 l/min. de Brouwer, modèle RTE 211, 220 v, 50 Hz, d'une gamme de température de -18°C à 100°C

- lampes IKEA avec tubes fluorescents OSRAM L 18W/41, Lumilux Interna rY6 et lampe avec tubes fluorescents OSRAM L 18W/10 lumière de jour
- préfiltre constitué d'une cartouche en verre remplie de Kieselgur imprégné de solution de KMnO_4 1M en proportions de 100g de Kieselgur pour 200 ml de KMnO_4 et fermée aux deux extrémités par de la laine de verre
- filtre constitué d'un flacon laveur à gaz de 1 litre rempli de charbon actif granulé 4-8 mm de Fluka n°05110

2.2.2 Expériences sur la conformité du dispositif expérimental

Etant conscients du fait qu'un matériel insuffisamment inerte peut modifier la composition de l'air, nous avons entrepris plusieurs expériences pour valider le choix et le montage du dispositif. Deux plans de mesures ont été prévus :

- s'assurer de l'efficacité de la filtration d'air
- observer le comportement de l'air ambiant dans le dispositif

Pour cela les mesures d'ozone, de dioxyde d'azote et, partiellement, d'oxyde de soufre et de monoxyde d'azote ont été effectuées à l'aide des appareils de routine appartenant au SEHL et de capteurs passifs O_3 (Passam, Maennedorf) et NO_2 (Laboratoire cantonal du Service de Lutte contre Nuisances (SLN), Lausanne).

Efficacité de la filtration.

Les mesures à l'aide des appareils de mesure d' O_3 , de NO_x et de SO_2 ont clairement démontré que le système de filtres élaboré éliminait 100% de ces gaz et resterait efficace, selon nos calculs, pendant au moins 6 semaines. Les essais d'exposition des capteurs passifs dans les incubateurs ont corroboré cette conclusion. Les concentrations d' O_3 et de NO_2 ont été d'environ 0-5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les deux incubateurs à l'air filtré.

Comportement de l'air ambiant dans le dispositif.

Les mesures à l'aide des appareils de mesure d' O_3 ont démontré que, dans les incubateurs sans bacs de croissance, le taux d'ozone s'élevait à 90-100% de celui qui y était injecté. Les essais d'exposition des capteurs passifs dans les incubateurs ont donné une valeur similaire pour O_3 - env. 75%, et encore meilleure pour NO_2 - env. 100%. Aucune différence due à la position des capteurs passifs dans les incubateurs n'a été constatée. En revanche, l'introduction des bacs de croissance avec les plantes induisait une forte réduction des concentrations de ces polluants. Au cours des expériences, le rapport des concentrations d' O_3 et de NO_2 dans les incubateurs à celles de l'extérieur mesurées par les capteurs passifs était d'environ 25-35% et 50%, respectivement. Ceci a été attribué à l'humidité plus élevée dans les incubateurs et aux interactions des plantes avec la pollution atmosphérique. Une partie importante pouvait également être absorbée par le terreau.

2.3 Expériences. Situation atmosphérique en ville de Lausanne.

Les émissions des polluants gazeux sont dispersées plus ou moins rapidement en fonction de la météorologie et de la topographie du site. Située en bordure d'un grand

lac et au pied d'une grande colline, l'agglomération lausannoise bénéficie d'une situation météorologique calme, de l'alternance des brises de lac et des brises de terre, qui lui donnent une certaine ventilation. Ces brises sont cependant faibles et leur effet sera plus ou moins prononcé suivant les conditions topographiques locales, le degré d'encaissement et l'orientation des rues. Par situation de vent établi, la topographie modifie localement la direction du vent et influence l'écoulement des masses d'air. Le quartier de Chauderon, surtout à l'altitude de la prise d'air, jouit d'une situation météorologique assez calme. Les valeurs de la pollution sont souvent inférieures à celles observées au niveau de la rue et dans d'autres quartiers de la ville. Il est pourtant à remarquer que la valeur limite annuelle de la concentration de NO₂ est largement dépassée dans toute l'agglomération lausannoise, et les dépassements de celle-ci pour l'ozone sont particulièrement fréquents en été. Par contre, les concentrations de SO₂ restent généralement au-dessous des normes prescrites toute l'année grâce aux mesures d'assainissement de l'air entreprises par la ville.

La ville de Lausanne dispose d'un vaste réseau de mesure de la pollution atmosphérique par les capteurs passifs ainsi que par les appareils de mesures. A la proximité du quartier de Chauderon un système de Differential Optic Absorbtion Spectrometry (DOAS) est installé. Il mesure les concentrations d'O₃, de NO₂ et de SO₂ par un faisceau lumineux émis d'un élément placé sur le toit du palais de Montbenon et analysé par un élément détecteur sur le toit du palais de la Rumine (voir la carte).

Expériences à la place Chauderon.

Les plantes ont été exposées dans les incubateurs pendant 3 ou 6 semaines. Pendant les expériences, les concentrations d'O₃ et d'NO₂ ont été contrôlées à l'aide des capteurs passifs installés dans les incubateurs et à l'extérieur sur le toit près de la prise d'air. En même temps, les valeurs de pollution lues par le système DOAS nous ont été transmises. Les valeurs des deux types se sont avérées bien corrélées. Les niveaux de la pollution atmosphérique pour les expériences e1-e7 sont résumés ci-dessous (Figure 4, Figure 5, Tableau 1, Tableau 2).Le débit d'air pour toutes les expériences était d'env. 8-9 l/min./incubateur. Les plantes ont été arrosées avec la solution nutritive en fonction des besoins, soit 2-4 fois par semaine.

<i>Expérience</i>	<i>Début</i>	<i>Fin</i>
e1	1.02.95	21.02.95
e2	10.03.95	30.03.95
e3	4.04.95	24.04.95
e4	11.04.95	30.04.95
e5	23.05.95	13.06.95
e6	6.06.95	27.06.95
e7	20.06.95	12.07.95

Tableau 1. Les dates des expériences.

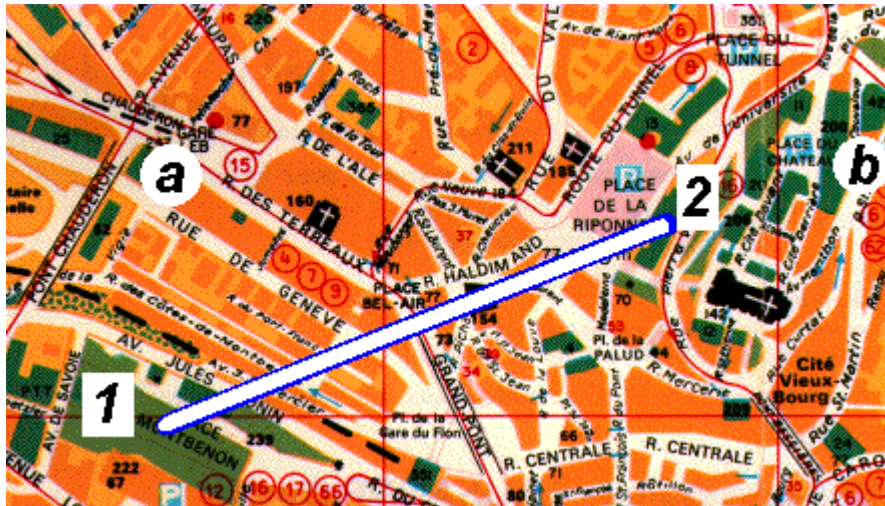


Figure 2. Sites d'exposition. a -Place Chauderon, site actuel; b -local technique à César Roux, site prévu pour la prochaine expérience; 1 -récepteur et 2 -émetteur du faisceau lumineux du système DOAS

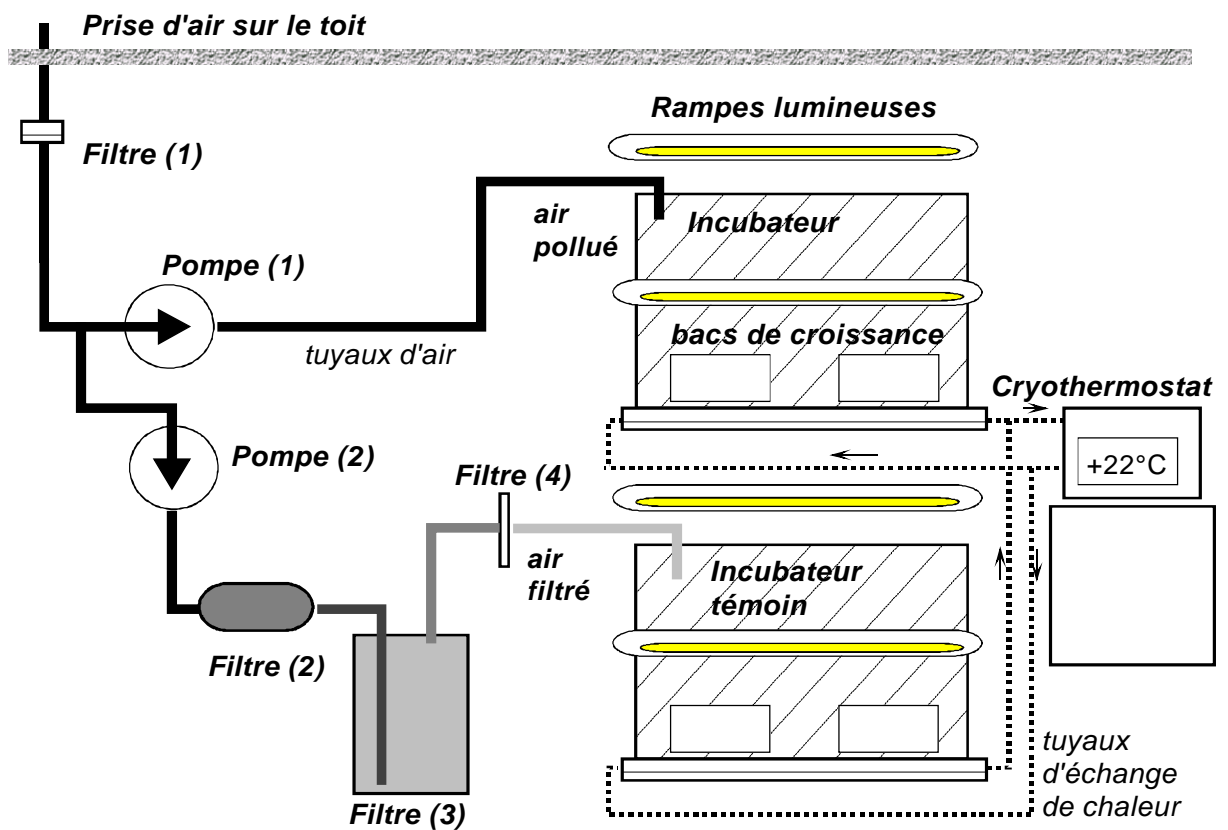


Figure 3. Dessin schématique du dispositif installé dans l'infrastructure du Bâtiment Administratif, place Chauderon 9. Filtres: 1- entièrement en Téflon, 2- oxydatif (KMnO_4), 3- en charbon actif, 4- en papier. Pompes: 1- tête entièrement en Téflon, 2- membrane en Téflon.

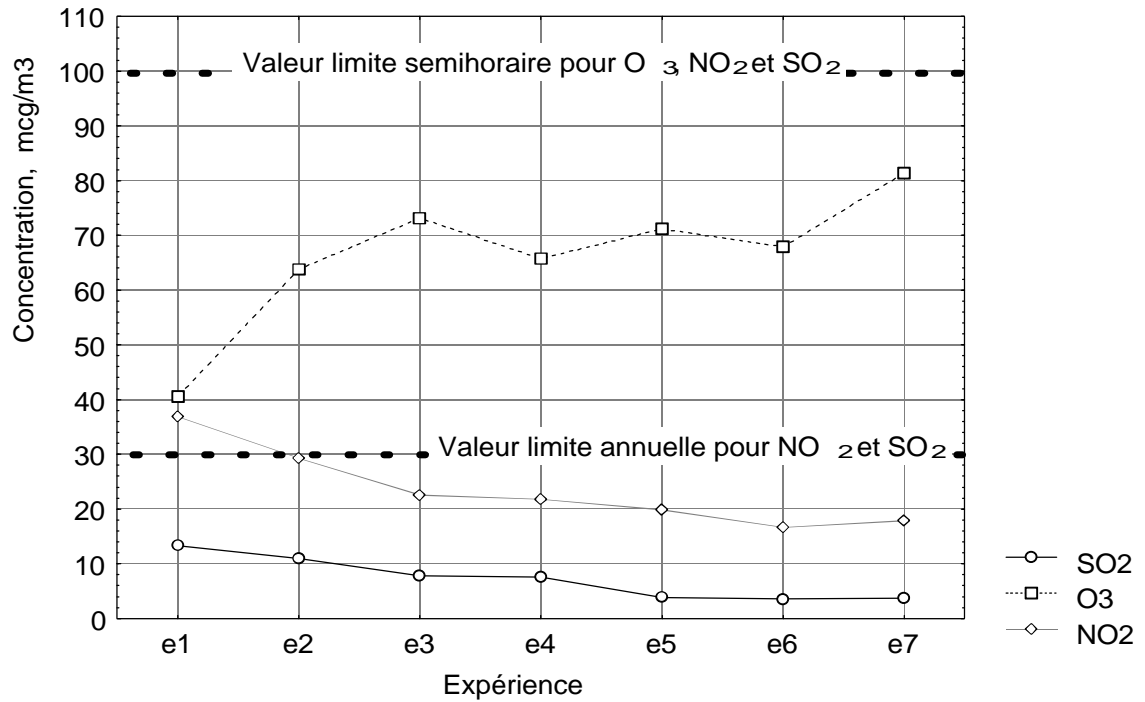


Figure 4. Les valeurs de la pollution atmosphérique au cours des expériences. Les moyennes sont calculées à partir des valeurs semi-horaires mesurées par le système DOAS depuis le début de l'exposition jusqu'au prélèvement. 95% (98% pour l'ozone) des concentrations moyennes semi-horaires d'une année (d'un mois pour l'ozone) doivent être inférieures aux valeurs limites semi-horaires. La concentration moyenne arithmétique annuelle doit être inférieure à la valeur limite annuelle.

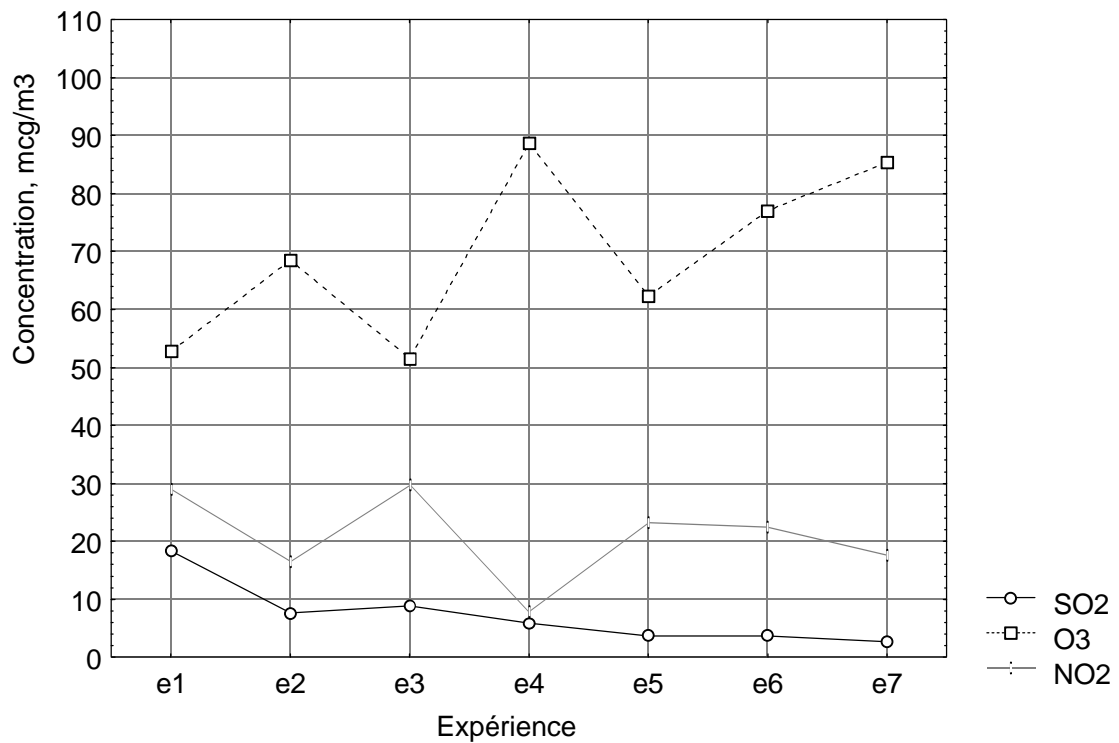


Figure 5. Les moyennes des 8 heures avant la récolte. Les récoltes étant effectuées pendant la matinée, les moyennes représentées sont calculées à partir des valeurs semi-horaires mesurées par le système DOAS entre 7h00 et 15h00 du jour de prélèvement.

Pourcentage des dépassements des valeurs limites semihoraires					
	Ozone	Oxyde de soufre	Oxyde d'azote		
e1	0.00%	0.00%	0.00%		
e2	4.08%	0.00%	2.19%		
e3	14.14%	0.00%	0.20%		
e4	10.34%	0.00%	0.11%		
e5	15.59%	0.00%	0.00%		
e6	7.23%	0.00%	0.00%		
e7	24.92%	0.00%	0.00%		

Tableau 2. Le pourcentage des dépassements représente un rapport du nombre des dépassements des valeurs limites semi-horaires au nombre des valeurs semi-horaires mesurées par le système DOAS.

2.4 Analyses

Les expositions de 6 semaines, ayant pour objectif les études de l'effet de la pollution atmosphérique sur les graines, ont révélé que le dispositif utilisé n'était pas approprié à ce genre d'analyse. Les plantes exposées pendant 6 semaines atteignaient l'âge de 7 semaines et développaient de grandes structures avec une ramification importante remplissant tout l'espace dans les bacs de croissance. Les branches enchevêtrées étant difficiles à séparer, l'analyse des graines est impossible. Même une réduction de la quantité de plantes jusqu'à 10 par bac n'a pas permis de résoudre ce problème et, en tous cas, ne se conformerait guère aux exigences des tests statistiques quant à l'effectif de l'échantillon de la population. Les résultats présentés ne portent alors que sur des expositions de 3 semaines.

2.4.1 Récolte et mesures biometriques

Les plantes sont récoltées à l'aide d'une pince, les racines sont coupées et jetées. Les tentatives de mesurer le rapport « tiges/racines » ont échoué parce qu'il est impossible de prélever les racines sans les endommager et leur poids est trop petit pour le déterminer précisément. Les mesures complètes avant la congélation des plantes comprennent les mesures de la longueur de la feuille maximale (distribuée entre le pétiole et le limbe), de la largeur de la feuille maximale, et du poids frais (PF). La multiplication de la longueur du limbe par sa largeur sert à estimer la surface foliaire (Figure 6). Immédiatement après ces mesures, les plantes sont congelées dans l'azote liquide et lyophilisées pendant au moins 48 heures. Le poids sec (PS) est ensuite déterminé. Pour les raisons qui vont être discutées ultérieurement, certaines de ces mesures n'ont pas été effectuées pour quelques expériences.

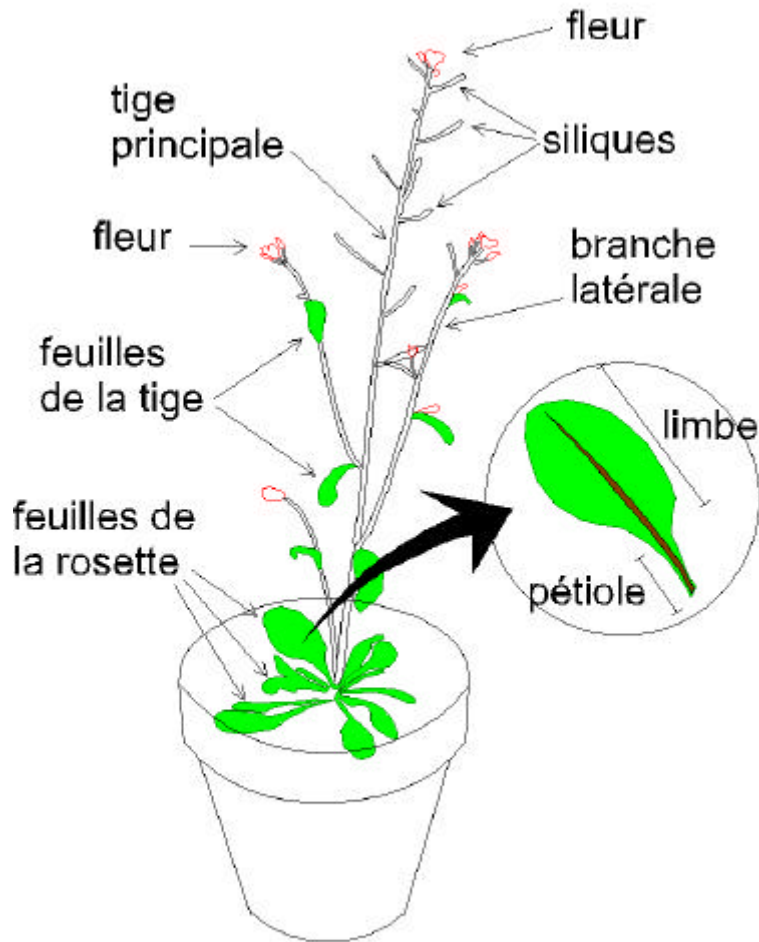


Figure 6. Dessin schématique de la plante *Arabidopsis thaliana*.

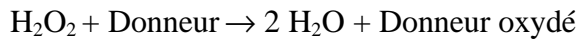
2.4.2 Dosages d'activités enzymatiques et de pigments

Préparation des extraits

Les plantes lyophilisées sont broyées individuellement à l'azote liquide dans un mortier pendant 1 minute. Toutes les étapes sont ensuite menées à 4°C. Un extrait brut est préparé dans un tampon phosphate pH 7.2 (KH_2O_4 5.15%, Na_2HPO_4 4.85%). L'extrait brut est ensuite centrifugé 15 min. à 5000 min^{-1} (Hettich Universal, 1975). Le surnageant utilisé pour les dosages enzymatiques peut être stocké au maximum 7 jours à 4°C. Les chlorophylles sont extraites du culot. Celui-ci est resuspendu dans 5ml d'éthanol. L'extraction se fait pendant 24 heures à température ambiante. L'extrait est centrifugé 15 min. à 5000 min^{-1} et le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour les dosages des chlorophylles.

Activité peroxydasique

Le dosage de l'activité peroxydasique est basé sur la réaction suivante, catalysée par les peroxydases :



le gaiacol étant le donneur.

Le milieu d'incubation contient 0.015% (v/v) de gaiacol (Fluka) et 4.6×10^{-5} % (v/v) de peroxyde d'hydrogène (Fluka). Le volume final est de 1.3 ml. La réaction est initiée par ajout de peroxyde d'hydrogène et le changement de coloration est suivi à 470 nm pendant 10 min. L'activité est présentée en unités arbitraires.

Activité spécifique (PX sp.), u.a. = $\Delta\text{Absorption} \times \text{Facteur de dilution} / \text{PS}$

Activité par rapport aux protéines solubles (PXtp) u.a. = $\Delta\text{Absorption} \times \text{Facteur de dilution} / \text{quantité totale des protéines solubles}$

Activité de glutathion réductase

Le dosage de l'activité de glutathion réductase est basé sur la réaction :



Le glutathion réduit est oxydé par l'acide 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoïque)(3,3'-6) (DTNB) qui se transforme en un ion coloré.

Le milieu d'incubation contient 0.6 mM DTNB (Sigma), 0.045 mM NADPH (Fluka), 0.015 mM glutathion oxydé (GSSG) (Fluka). Le volume final est de 1.3 ml. La réaction est initiée par ajout de GSSG et le changement de coloration est suivi à 412 nm pendant 13 min. L'activité est présentée en unités arbitraires.

Activité spécifique (GR sp), u.a. = $\Delta\text{Absorption} \times \text{Facteur de dilution} / \text{PS}$

Activité par rapport aux protéines solubles (GRtp), u.a. = $\Delta\text{Absorption} \times \text{Facteur de dilution} / \text{quantité totale des protéines solubles}$.

Protéines totales solubles

La concentration totale de protéines solubles est déterminée suivant la méthode colorimétrique de Bradford 1976, par comparaison avec une gamme étalon réalisée avec de la sérum albumine de boeuf (Sigma) et établie pour chaque série de dosages. La concentration est présentée en mg/g de poids sec

Chlorophylles A et B

Les concentrations de chlorophylles sont déterminées d'après Knudson et al. 1977. L'absorption à 649 et 665 nm est mesurée et les concentrations calculées selon les formules :

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/plante}) = ((13.70)(A_{665 \text{ nm}}) - (5.76)(A_{449 \text{ nm}}))V_{\text{extraction}}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/plante}) = ((25.80)(A_{449 \text{ nm}}) - (7.60)(A_{665 \text{ nm}}))V_{\text{extraction}}$$

Les valeurs sont ensuite rapportées aux poids sec:

$$\text{Chl a sp.} (\mu\text{g/g de pois sec}) = \text{Chl a} / \text{PS}$$

$$\text{Chl b sp.} (\mu\text{g/g de pois sec}) = \text{Chl b} / \text{PS}$$

$$\text{Le rapport B/A} = \text{Chl b} / \text{Chl a}$$

Validation des méthodes

Les essais ont été effectués pour établir les altérations des activités enzymatiques et de la teneur en pigments provoquées par la lyophilisation et les deux extractions. Les plantes cultivées en phytoclimatiseur ont été divisées en deux lots. Un lot (témoin) a été traité comme décrit ci-dessus, l'autre lot a été subdivisé en groupes et les mesures ont été effectuées séparément sur les plantes fraîches. Aucune différence significative n'a été constatée.

D'autres essais ont démontré que, dans les conditions des dosages, l'activité enzymatique, ainsi que la concentration de protéines solubles, est maintenue dans les extraits pendant au moins 7 jours (les peroxydases sont actives pendant au moins 3 semaines).

2.5 Etudes statistiques

Les comparaisons se font entre les populations des plantes traitées et témoins.

Pour la comparaison des **moyennes** le test U de Mann-Whitney a été appliqué. Proprement dit, la moyenne n'étant pas comprise dans le calcul de la statistique du test, le test porte sur la **tendance centrale**, ou, en d'autres termes, sur l'ensemble de l'échantillon.

H_0 : il n'existe aucune différence entre les tendances centrales des deux populations

H_a : il existe une différence entre les tendances centrales des deux populations

Pour ce test *nonparamétrique* au lieu des valeurs réelles on utilise les rangs. Les données sont classées par ordre croissant ou décroissant. La statistique du test, U, est alors calculée :

$$U = n_1 n_2 + n_1(n_1 + 1)/2 - r_1$$

$$U' = n_1 n_2 - U$$

où

r_1 est la somme des rangs de l'échantillon 1

n_1 ou n_2 est l'effectif de l'échantillon 1 ou 2, respectivement.

Les valeurs U et U' sont comparées aux valeurs théoriques U_{p,n_1,n_2} . Si U ou U' les dépassent ou leur équivalent, l' H_0 est rejetée au niveau de probabilité d'erreur p .

Pour la comparaison des **variances** le test de Levene a été appliqué. La conclusion faite à partir du test sur les variances peut être extrapolée sur la variabilité dans les populations [Brown et Forsythe 1974].

H_0 : il n'existe aucune différence entre les variances des deux populations

H_a : il existe une différence entre les variances des deux populations

Il est à noter que le test n'implique aucune restriction quant aux moyennes des populations ni à leur distribution ni à leur effectif.

Pour ce test *paramétrique* la statistique, W_0 , est alors calculée :

$$W_0 = (S_i n_i (\underline{z}_i - \underline{z}_{..})^2 / (g-1)) / (S_i S_j (z_{ij} - \underline{z}_i)^2 / S_i (n_i - 1))$$

où

g est le nombre d'échantillons à comparer. Dans notre cas, $g=2$

$$z_{ij} = \hat{\theta} x_{ij} - \underline{x}_i \hat{\theta}$$

x_{ij} est un paramètre de la j^{me} plante du i^{me} échantillon

$$\underline{x}_i = S x_i / n_i$$

$$\underline{z}_i = S z_{ij} / n_i$$

$$\underline{z}_{..} = S S z_{ij} / S n_i$$

n_i est l'effectif de l'échantillon 1 ou 2

La valeur W_0 est comparée aux valeurs théoriques $W_p, 1, S_i(n_i-1)$. Si la valeur W_0 les dépasse ou leur est égale, alors l' H_0 est rejetée au niveau de probabilité d'erreur p .

Le même test de Levene a été appliqué pour la comparaison des **coefficients de variation**. Dans ce cas au lieu des valeurs réelles on utilise leur logarithme [Sokal et Braumann 1980]. Ceci permet d'éliminer l'influence de l'échelle sur l'interprétation du résultat. En effet, si les moyennes sont identiques, le changement de la variance peut être expliqué par le changement de la variabilité induite uniquement par l'effet du traitement. Dans les cas où les moyennes sont très différentes, le changement de la variance peut être expliqué également par des raisons *mathématiques*².

H_0 : il n'existe aucune différence entre les coefficients de variation des deux populations

H_a : il existe une différence entre les coefficients de variation des deux populations

Tous les tests de comparaison sont appliqués également pour vérifier les différences entre les incubateurs. Si la différence entre les incubateurs du même traitement est supérieure à celle entre les traitements, aucune conclusion sur l'effet du traitement ne peut être tirée.

Il est important de noter qu'une différence *significative* ne correspond pas obligatoirement à une différence *importante*. En effet, le terme *significatif* se réfère à la fiabilité de la conclusion, alors que le terme *important* se réfère à sa valeur. Par conséquent, une petite (faible) différence peut être significative etc.. Si la différence constatée n'est pas significative (i.e. peu fiable), on peut tout de même prononcer une conclusion sur la *tendance*.

Le test W de Shapiro et Wilk a été appliqué pour analyser la distribution des populations.

H_0 : La distribution au sein de la population est normale

² Effectivement, les échantillons avec une moyenne plus grande ont tendance d'avoir une variance plus grande. Ceci s'explique par le fait que le calcul de la variance implique les écarts *absolus*.

H_a : La distribution au sein de la population n'est pas normale

Les propriétés importantes de la distribution normale (autrement dit la distribution de Laplace-Gauss) :

- La distribution se fonde sur la loi de Laplace-Gauss

$$p(X) = 1/\sqrt{2\pi\sigma^2} e^{-(x-\mu)/2\sigma^2}$$

où $p(X)$ est la densité de probabilité de rencontrer la valeur x

μ et σ^2 sont la moyenne et la variance de la population

- La distribution est symétrique par rapport à sa moyenne

Les calculs du test étant très encombrants, nous ne les présentons pas ici. Les valeurs du degré d'asymétrie ne sont présentées qu'à titre indicatif, aucun test fiable et simple pour leur comparaison n'étant disponible.

Tous les tests sont calculés à partir de l'application STATISTICA 5.0 pour Windows.

3. Résultats

Le résumé pour chaque expérience est présenté dans un tableau. Les résultats détaillés sont disponibles au Laboratoire de Phytogénétique Cellulaire.

3.1 Expérience e1. (1.2.95-21.2.95)

Tableau 3. Résumé des résultats de l'expérience e1. Explication en note³.

$n_1=98$ $n_2=77$	Moyenne: différence xxxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
Diamax	-21% 0.00	93% 0.00	11.09% 0.00	anormale 0.00	anormale 0.00	0.74
PF	-22% 0.00	-9% ns	8.56% ns	normale	anormale 0.00	1.04
PS	-23% 0.00	-21% ns	6.96% ns	normale	anormale 0.00	7.73
PXsp	-6% 0.02	111% ns	17.95% ns	anormale 0.04	anormale 0.00	6.81
Chl A sp.	12% 0.00	78% ns	6.62% ns	anormale 0.03	anormale 0.00	8.44
Chl B sp.	-4% ns	40% ns	7.59% ns	anormale 0.01	anormale 0.00	9.39
B/A	-16% 0.00	-45% 0.03	-3.92% 0.05	anormale 0.01	anormale 0.00	1.94

³Moyenne: Différence,% = (Moyenne traité - Moyenne témoin) / Moyenne témoin * 100%.

Variance: Différence,% = (Variance traité - Variance témoin) / Variance témoin * 100%.

Coefficient de variation (Cv): Différence,% = Cv(%)_{traité} - Cv(%)_{témoin}

Degré d'asymétrie (S): Différence = S traité - S témoin

Les différences significatives (à $p < 0.05$) sont mises en gras. Les valeurs de p se réfèrent aux tests correspondants (cf. paragraphe 2.5)

Abbreviations:

Diamax - la longueur de la feuille maximale; L/P - le rapport des longueur du limbe et du pétiole; PF - poids frais; PS - poids sec; TPPS - concentration totale en protéines solubles; PXsp, PXtp, GRsp, GRtp - activités enzymatiques (cf. paragraphe 0); Chl A sp, Chl B sp, B/A - concentrations de chlorophylles et leur rapport (cf. paragraphe 0); n_1 - effectif de l'échantillon traité, n_2 - effectif de l'échantillon témoin.

La première expérience a démontré que les plantes réagissent à la pollution d'une façon mesurable. Une diminution significative et importante du taux de croissance, du rapport B/A et une augmentation de la concentration de chlorophylle *a* sont constatées pour les plantes soumises à la pollution. Une faible diminution de l'activité PXsp peut être expliquée par le fait que les concentrations d'O₃ et de SO₂ étaient basses pendant l'exposition. Par contre, l'augmentation de Chl A sp. pourrait être attribuée aux concentrations élevées de NO₂.

On peut remarquer que la variabilité de tous les paramètres au sein de l'échantillon soumis à la pollution révèle une tendance à l'augmentation (significative pour la longueur de la feuille maximale). L'augmentation du coefficient de variation du rapport B/A la corrélation entre les concentrations de chlorophylles qui est plus forte chez les plantes traitées [Lande 1980].

Une bonne correspondance entre les réponses de la variance et du coefficient de variation est observée dans le cas où les moyennes ne sont pas très différentes. Il est intéressant de remarquer que, quoiqu'elle soit non-significative, la réduction de la variance de PF et de PS est visiblement due à la réduction de la moyenne, comme l'augmentation du coefficient de variation le confirme. Ici, on rencontre le premier exemple où l'effet mathématique de la réduction de la moyenne sur la variance peut influencer la conclusion sur la variabilité (paragraphe 2.5). Dans ce cas, la conclusion doit être faite sur le coefficient de variation.

La distribution des deux échantillons est plutôt anormale. Pour deux des paramètres mesurés (PF et PS) l'anormalité n'est observée que pour l'échantillon traité.

Le degré d'asymétrie plus élevé dans l'échantillon traité montre que la distribution est plus tassé vers les petites valeurs.

3.2 Expérience e2 (10.3.95 -30.3.95)

Tableau 4. Résumé des résultats de l'expérience e2. Explications en note 3.

$n_1=50$ $n_2=48$	Moyenne: différence xxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
Diamax	-1% <i>ns</i>	134% 0.03	6.49% 0.05	anormale 0.00	normale	0.90
PF	-11% <i>ns</i>	299% 0.00	28.41% 0.00	normale	anormale 0.00	2.24

Pour l'expérience e2 deux paramètres seulement (la longueur de la feuille maximale et PF) ont pu être mesurés à cause d'un problème technique pendant la lyophilisation.

La même tendance de diminution du taux de croissance des plantes traitées peut être observée. Néanmoins, les différences sont faibles et non-significatives. En revanche, une forte augmentation significative de la variabilité au sein de l'échantillon traité est constatée. Pour les deux paramètres la différence de la variance correspond à celle du coefficient de variation.

Aucune conclusion durable ne peut être donnée sur la normalité des paramètres. Le degré d'asymétrie plus élevé indique que la distribution de l'échantillon traité est plus tassée vers les petites valeurs.

Une autre observation intéressante est faite pour les plantes traitées: elles présentent des feuilles avec un limbe moins développé que chez les plantes témoins. Afin de confirmer cette observation, les mesures de la longueur du pétiole et du limbe de la feuille maximale ont été prévues pour la prochaine expérience.

3.3 Expérience e3. (4.4.95-24.4.95)

Tableau 5. Résumé des résultats de l'expérience e3. Explication en note3.

n ₁ =98 n ₂ =99	Moyenne: différence xxxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
Pétiole	5% 0.00	155% 0.00	5.90% 0.02	anormale 0.00	anormale 0.00	-0.22
Limbe	-15% 0.00	21% ns	6.51% ns	normale	anormale 0.00	-.42
L/P	-20% 0.00	-19% ns	2.64% ns	normale	normale	-0.32
Diamax	-4% ns	84% ns	5.73% ns	normale	anormale 0.00	-.55
PF	7% ns	74% ns	7.50% ns	normale	normale	0.17
PS	-1% ns	122% 0.01	16.14% 0.00	anormale 0.03	anormale 0.03	0.68
TPPS	6% ns	213% ns	4.90% ns	normale	normale	0.05
PXsp	52% 0.00	295% 0.01	16.85% ns	anormale 0.00	anormale 0.00	2.71
PXtp	44% 0.00	55% ns	-8.59% ns	anormale 0.00	anormale 0.00	-1.42
GRsp	59% 0.00	182% ns	4.02% 0.05	anormale 0.00	anormale 0.00	2.59
GRtp	54% 0.00	6% ns	-24.60% 0.00	anormale 0.00	anormale 0.00	-1.00
Chl A sp.	31% 0.00	578% 0.00	19.34% 0.00	normale	anormale 0.00	2.55
Chl B sp.	23% 0.00	440% 0.00	18.52% 0.00	anormale 0.01	anormale 0.00	2.07
B/A	-6% 0.00	-71% 0.00	-3.74% 0.01	anormale 0.01	normale	-1.93

Les mesures du pétiole et du limbe ont confirmé, que les limbes des plantes traitées sont moins développés que ceux des plantes témoins. Une différence significative mais faible est constatée entre les longueurs des pétioles; cela a contribué à une forte différence significative du rapport L/P. En outre, les différences de PF, de PS et de TPPS se révèlent faibles et non-significatives.

Cette fois, les activités des enzymes de protection contre le stress oxydatif sont fortement élevées chez les plantes traitées. Ceci est d'autant plus intéressant que les concentrations d'O₃ sont sensiblement plus hautes que celles observées pendant l'expérience e1. De plus, plusieurs dépassements de la valeur limite semi-horaire ont été enregistrés pour cette période.

La tendance d'augmentation des concentrations de chlorophylles s'est accentuée. Avec l'augmentation de la concentration Chl B sp., on constate une réduction de la différence entre les traitements du rapport B/A par rapport à l'expérience précédente.

On peut observer de nouveau une tendance à l'augmentation de la variabilité des paramètres biométriques chez les plantes traitées. Elle est surtout significative pour la longueur du pétiole et encore plus importante pour PS. La réduction de la variance du rapport L/P est visiblement due à la réduction de la moyenne, comme l'augmentation du coefficient de variation le confirme.

Les concentrations de chlorophylles et les activités spécifiques des enzymes montrent la même tendance. Par contre, l'activité enzymatique par rapport à la concentration de protéines solubles présente une variabilité supérieure (et significativement pour GRtp) dans l'échantillon témoin. Ici aussi, la divergence entre les conclusions basées sur la variance et le coefficient de variation s'explique par la forte différence significative entre la moyenne. L'augmentation de la moyenne entraîne l'augmentation de la variance pour des raisons mathématiques qui, dans ce cas, dominant l'effet du traitement.

Le manque de stabilité de la différence entre les distributions et les degrés d'asymétrie ne nous permet de faire aucune conclusion sur l'influence du stress sur ces paramètres de la population. L'observation que plus de paramètres sont distribués anormalement au sein de l'échantillon traité avec un degré d'asymétrie plus élevé ne peut être ni prouvée ni testée statistiquement. Pour cette raison, nous omettons cette discussion pour les autres expériences.

3.4 Expérience e4 (11.4.95-30.4.95)

Tableau 6. Résumé des résultats de l'expérience e4. Explication en note 3.

n ₁ =51 n ₂ =49	Moyenne: différence xxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
Pétiole	4%	103%	3.79%	normale	anormale	0.23
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		0.02	
Limbe	-14%	94%	9.00%	normale	anormale	0.65
	0.00	<i>ns</i>	0.00		0.03	
Largeur	-6%	233%	8.73%	anormale	normale	0.21
	<i>ns</i>	0.00	0.00	0.00		
L/P	-17%	55	3.79%	normale	anormale	-0.06
	0.00	<i>ns</i>	0.05		0.04	
Surface	-17%	144%	18.62%	normale	anormale	0.78
	0.00	0.02	0.00		0.00	
Diamax	-4%	143%	6.07%	normale	normale	0.68
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.02			
PF	-6%	164%	19.43%	normale	anormale	1.61
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		0.00	
PS	-5%	102%	14.93%	normale	anormale	1.07
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		0.00	
TPPS	18%	54%	1.60%	normale	normale	-0.10
	0.02	<i>ns</i>	<i>ns</i>			
PXsp	-14%	-40%	-5.61%	anormale	anormale	0.22
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.04	0.00	
PXtp	-19%	-26%	3.53%	anormale	anormale	0.93
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.01	0.00	
GRsp	-20%	-4%	17.18%	anormale	anormale	0.85
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.00	0.00	
GRtp	-29%	-36%	9.69%	anormale	anormale	0.85
	<i>ns</i>	0.00	<i>ns</i>	0.00	0.00	

	<i>Moyenne: différence</i> xxxxxxxxxxx	<i>Variance: différence</i> xxxxxxxxxxx	<i>C. variation: différence</i> xxxxxxxxxxx	<i>Distribution, témoin</i> xxxxxxxxxxx	<i>Distribution, traité</i> xxxxxxxxxxx	<i>Degré d'asymétrie, différence</i>
Chl A sp.	3% <i>ns</i>	61% <i>ns</i>	4.18% <i>ns</i>	normale	normale	
Chl B sp.	3% <i>ns</i>	111% <i>ns</i>	6.41% <i>ns</i>	normale	anormale <i>0.00</i>	
B/A	0% <i>ns</i>	12% <i>ns</i>	0.32% <i>ns</i>	anormale <i>0.00</i>	anormale <i>0.00</i>	

Une mesure de la largeur de la feuille maximale est introduite pour compléter les mesures du limbe. Ceci a permis de prouver statistiquement que la surface foliaire des plantes traitées est moins développée que celle des plantes témoins. Le rapport L/P, la longueur de la feuille maximale, du limbe et du pétiole suivent la même tendance (cf. l'expérience e3) . PF et PS ont une tendance vers la réduction de la moyenne et vers l'augmentation de la variabilité dans l'échantillon traité. TPPS montre une augmentation de la moyenne et une faible tendance vers l'augmentation de la variabilité.

Aucune conclusion ne peut être prononcée quant à l'activité enzymatique. Une différence est constatée non seulement entre les traitements mais aussi entre les lots du même traitement. Nous supposons, que le délai accru du transport des plantes suivi des mesures de la largeur de la feuille maximale, effectuées avant la congélation, a perturbé la réponse des plantes à la pollution atmosphérique. C'est pour cette raison que seules les mesures après congélation sont effectuées sur les plantes de la prochaine expérience.

Les concentrations de chlorophylles exhibent la même tendance, mais les différences ne sont pas significatives. Aucune différence importante n'est constatée pour le rapport B/A.

3.5 Expérience e5 (23.5.95-13.6.95)

Tableau 7. Résumé des résultats de l'expérience e5. Explication en note 3.

n ₁ =101 n ₂ =100	Moyenne: différence xxxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
PS	-36% 0.00	-16% <i>ns</i>	13.52% 0.00	anormale 0.00	anormale 0.00	0.07
TPPS	26% 0.00	194% 0.00	10.7% 0.02	normale	anormale 0.00	0.50
PXsp	55% 0.00	276% 0.00	11.34% <i>ns</i>	anormale 0.00	anormale 0.00	0.72
PXtp	23% 0.03	90% 0.00	5.79 <i>ns</i>	anormale 0.00	anormale 0.00	-0.13
GRsp	41% 0.02	646% 0.00	35.89% 0.00	normale	anormale 0.00	1.46
GRtp	10% <i>ns</i>	234% 0.00	21.87% 0.00	normale	normale	0.14
Chl A sp.	17% 0.00	801% 0.00	21.66% 0.01	normale	anormale 0.00	5.45
Chl B sp.	17% 0.00	652% 0.01	20.14% 0.03	normale	anormale 0.00	4.71
B/A	0% <i>ns</i>	-76% 0.00	-3.21% 0.00	normale	normale	-0.47

A partir de cette expérience débutée au mois de mai, la température a été maintenue dans l'intervalle optimal de la croissance par un cryothermostat (voir paragraphe 2.2.1).

Pour cette expérience aucune mesure n'a été effectuée avant la congélation.

La moyenne et la variabilité de TPPS exhibent la même tendance vers l'augmentation chez les plantes traitées. PS des plantes traitées est dramatiquement réduit par rapport aux témoins. C'est donc évident que les conclusions basées sur la variance et le coefficient de variation se contredisent: la diminution de la variance (quoique non-significative) est incontestablement entraînée par la forte diminution de la moyenne. En revanche, une augmentation des coefficients de variation au sein de l'échantillon traité est observée. En toute hypothèse, on peut constater une augmentation de la variabilité de la population sous l'effet de la pollution atmosphérique. Il en va de même pour

l'activité enzymatique et les concentrations de chlorophylles. Tous ces paramètres indiquent une augmentation importante de la variabilité dans l'échantillon traité.

En se fondant sur la tendance centrale, nous pouvons noter que l'activité des enzymes de protection contre le stress oxydatif et les concentrations de chlorophylles accroissent sensiblement et significativement chez les plantes soumises à la pollution atmosphérique. Ceci est fort probablement provoqué par des concentrations élevées du polluant oxydatif O₃, dont les dépassements de la valeur limite semi-horaire sont de plus en plus fréquents.

Par contre, comme dans l'expérience précédente, aucune différence du rapport B/A n'est révélée.

3.6 Expérience e6 (6.6.95-27.6.95)

Tableau 8. Résumé des résultats de l'expérience e6. Explication en note 3.

n ₁ =100 n ₂ =102	Moyenne: différence xxxxxxxxxx	Variance: différence xxxxxxxxxx	C. variation: différence xxxxxxxxxxxx	Distribution, témoin xxxxxxxxxxxx	Distribution, traité xxxxxxxxxxxx	Degré d'asymétrie, différence
Pétiole	-2%	32%	3.08%	anormale	anormale	-0.91
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.00	0.00	
Limbe	-31%	-45%	1.94%	normale	normale	0.06
	0.00	0.00	<i>ns</i>			
Largeur	-15%	19%	4.62%	anormale	anormale	-0.85
	0.00	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.00	0.00	
L/P	-30%	-49%	0.56%	normale	anormale	1.71
	0.00	0.00	<i>ns</i>		0.00	
Surface	-41%	-53%	5.23%	normale	normale	-0.05
	0.00	0.00	<i>ns</i>			
Diamax	-15%	17%	4.37%	normale	anormale	-0.63
	0.00	<i>ns</i>	<i>ns</i>		0.00	
PS	-42%	-78%	-8.29%	anormale	anormale	-0.067
	0.00	0.00	<i>ns</i>	0.00	0.00	
TPPS	-16%	59%	18.02%	normale	normale	-0.13
	<i>ns</i>	0.04	0.02			
PXsp	-7%	56%	16.04%	anormale	anormale	0.74
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.00	0.00	
PXtp	15%	306%	29.31%	anormale	anormale	1.97
	<i>ns</i>	0.03	<i>ns</i>	0.00	0.00	
GRsp	37%	468%	28.51%	anormale	anormale	0.46
	<i>ns</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	
GRtp	73%	269%	5.37%	anormale	anormale	-1.44
	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	

	<i>Moyenne: différence</i> xxxxxxxxxxxx	<i>Variance: différence</i> xxxxxxxxxxxx	<i>C. variation: différence</i> xxxxxxxxxxxx	<i>Distribution, témoin</i> xxxxxxxxxxxx	<i>Distribution, traité</i> xxxxxxxxxxxx	<i>Degré d'asymétrie, différence</i>
Chl A sp.	62% <i>0.00</i>	145% <i>0.00</i>	-2.06% <i>ns</i>	anormale <i>0.00</i>	anormale <i>0.00</i>	-0.32
Chl B sp.	65% <i>0.00</i>	39% <i>0.01</i>	-23.26% <i>ns</i>	anormale <i>0.00</i>	anormale <i>0.00</i>	-0.44
B/A	5% <i>0.00</i>	67% <i>ns</i>	1.98% <i>ns</i>	anormale <i>0.00</i>	anormale <i>0.00</i>	-0.94

Dans cette expérience on peut facilement constater une diminution du taux de croissance des plantes traitées. Or, il faut bien tenir compte du fait que la diminution drastique des moyennes entraîne une réduction de la variance qui ne signifie guère une réduction de la variabilité. Au contraire, en s'abstrayant de l'effet mathématique, on peut établir une faible tendance vers l'augmentation de la variabilité. Ce n'est pas le cas pour le PS, où nous observons une diminution du coefficient de variation pour les plantes traitées. Il est pourtant impossible de se prononcer en toute hypothèse sans autres données sur la fiabilité de cette différence. Aucune conclusion ne peut être donnée sur TPPS. Inversement aux expériences précédentes, la moyenne a une tendance vers la diminution; mais la variabilité est toujours supérieure pour les plantes traitées.

Malgré le délai entre la récolte et la congélation fortement réduit, aucune différence significative d'activité PX et GR similaire à celle de l'expérience e5 n'a pu être établie. Il est à remarquer que les concentrations de polluants oxydatifs sont restées presque au même niveau que pendant l'expérience e5. Afin de vérifier si les mesures biométriques manuelles perturbent la réponse des plantes à la pollution atmosphérique, une autre expérience avec deux lots de plantes (mesurées avant la congélation - congelées immédiatement) est proposée. Ses résultats permettront d'établir la corrélation entre les manipulations et l'activité PX et GR (voir aussi 4.Discussion).

La moyenne des concentrations de chlorophylles dans les plantes traitées est sensiblement élevée par rapport aux témoins. Apparemment, ceci explique l'augmentation de la variance dans l'échantillon soumis à la pollution. Il est d'ailleurs impossible d'établir le vrai effet du traitement sur la variabilité pour ces paramètres dans cette expérience, la différence entre les coefficients de variation étant non-significative. Une faible augmentation du rapport B/A est également constatée.

Nous ne présentons pas ici les résultats de l'expérience e7. Un fort développement de moisissure dans les bacs de croissance et des algues sur le fond des incubateurs 1 (l'air filtré), 3 et 4 (l'air pollué) a sensiblement interféré avec l'effet de la pollution atmosphérique sur les plantes. Nous supposons que ceci a été provoqué par la contamination du terreau ainsi que par une légère inclinaison des incubateurs qui a influencé la distribution normale de l'humidité. Bien que les plantes traitées représentent toujours un taux de croissance inférieur à celui des plantes témoins, les observations ne sont pas fiables et aucune conclusion valide ne peut être faite.

3.7 Tendance saisonnière

Il serait intéressant d'observer la tendance de la réponse des plantes au stress de la pollution atmosphérique au cours de l'année. Il existe pourtant quelques problèmes qui remettent en question la fiabilité de cette analyse sur les données obtenues:

- Plusieurs différences remarquées entre les plantes traitées et témoins ne sont pas significatives, même si elles sont importantes. Ceci rend l'analyse incomplète.
- Il existe une différence entre les plantes témoins mesurée au cours de l'année en dépit de nos efforts de contrôler les conditions de croissance. Ceci est très probablement dû à la mauvaise technique de contrôle de température. Au lieu de refroidir ou réchauffer les incubateur par le fond (ce qui crée un gradient de température à l'intérieur), il serait préférable de contrôler la température de l'air avant de l'injecter dans les incubateurs. Une autre raison de fluctuations au cours de l'année serait le terreau. Acheté chez "Migros", il n'est pas d'une qualité irréprochable et varie de lot en lot. Un achat d'un seul lot pour toutes les expériences a causé un problème de son stockage. Des altérations qui se sont produites pendant le stockage ont pu être sensibles.

Nous représentons tout de même quelques tendances dans les graphiques qui suivent.

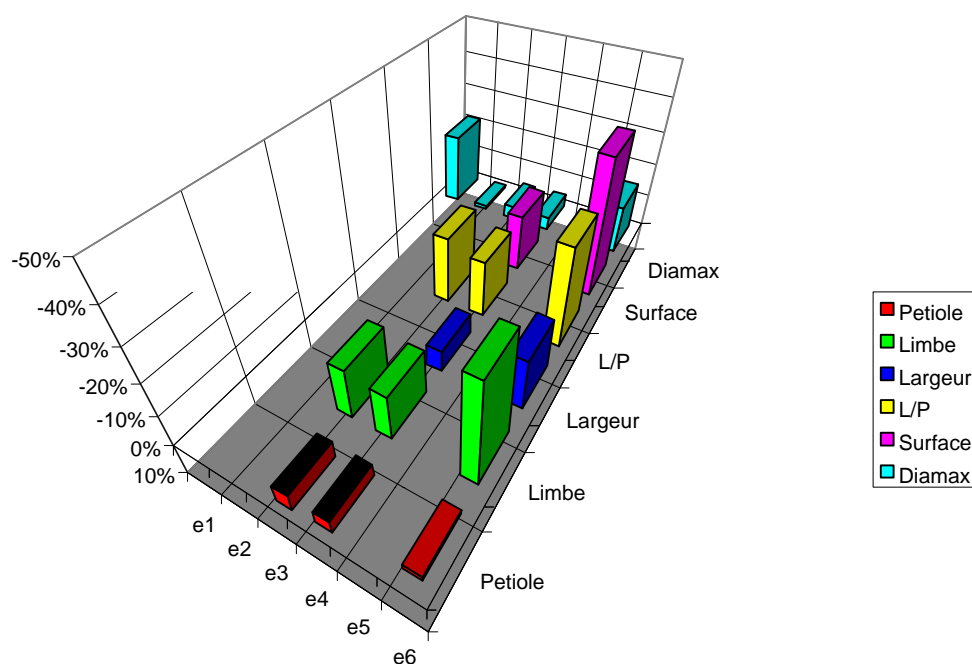


Figure 7. Les tendances des moyennes suivies pour les paramètres biométriques au cours des expériences.

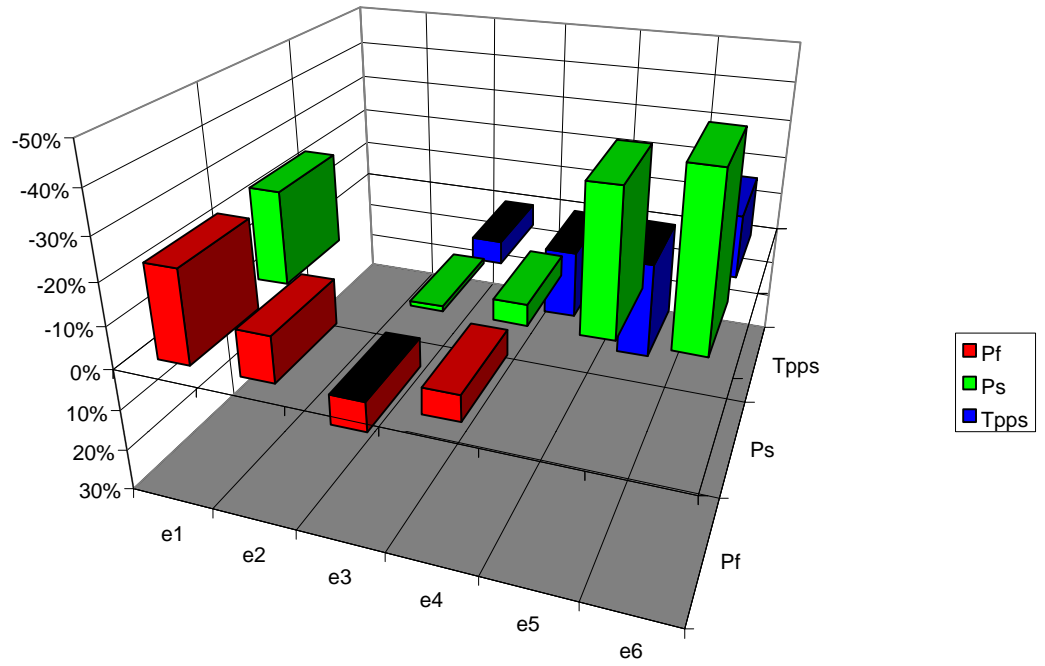


Figure 8. Les tendances des moyennes suivies pour les poids sec et frais et la concentration totale de protéines solubles au cours des expériences.

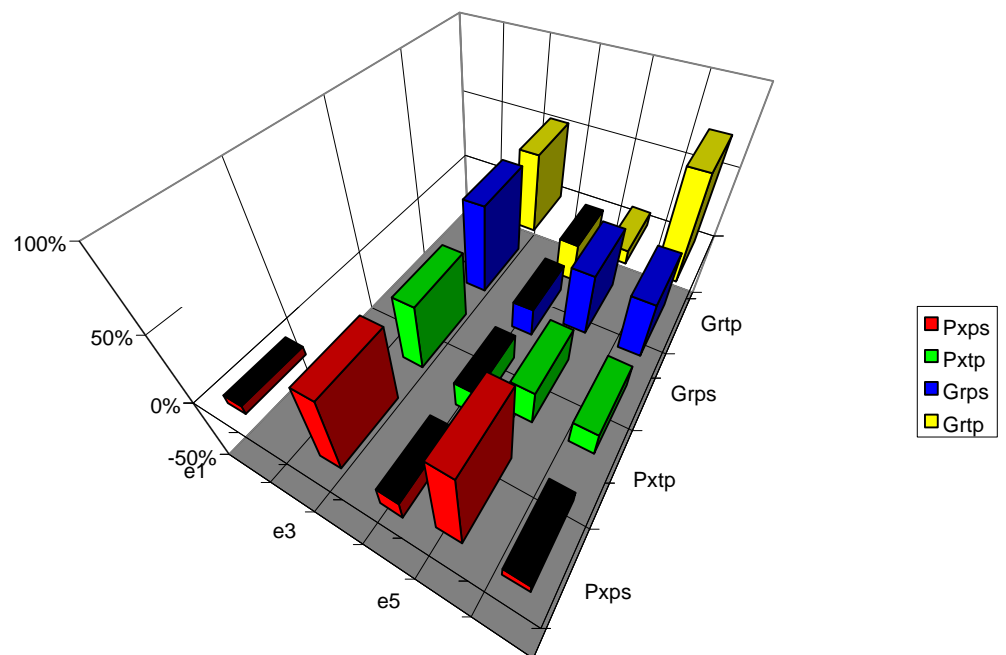


Figure 9. Les tendances des moyennes suivies pour l'activité des enzymes de protection contre le stress oxydatif au cours des expériences.

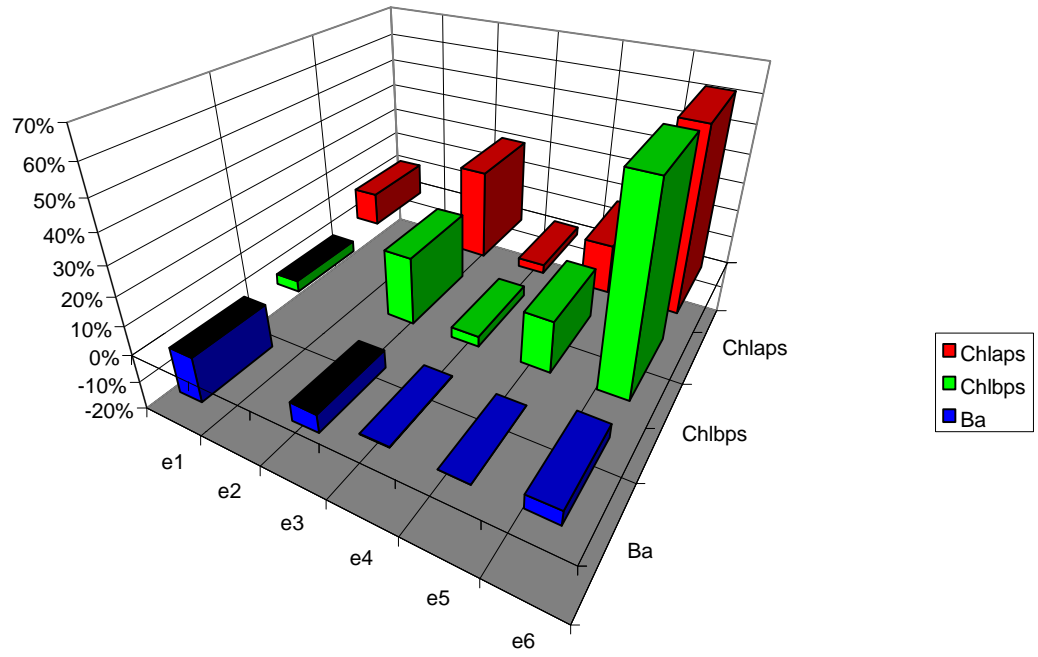


Figure 10. Les tendances des moyennes suivies pour les concentrations de chlorophylles au cours des expériences.

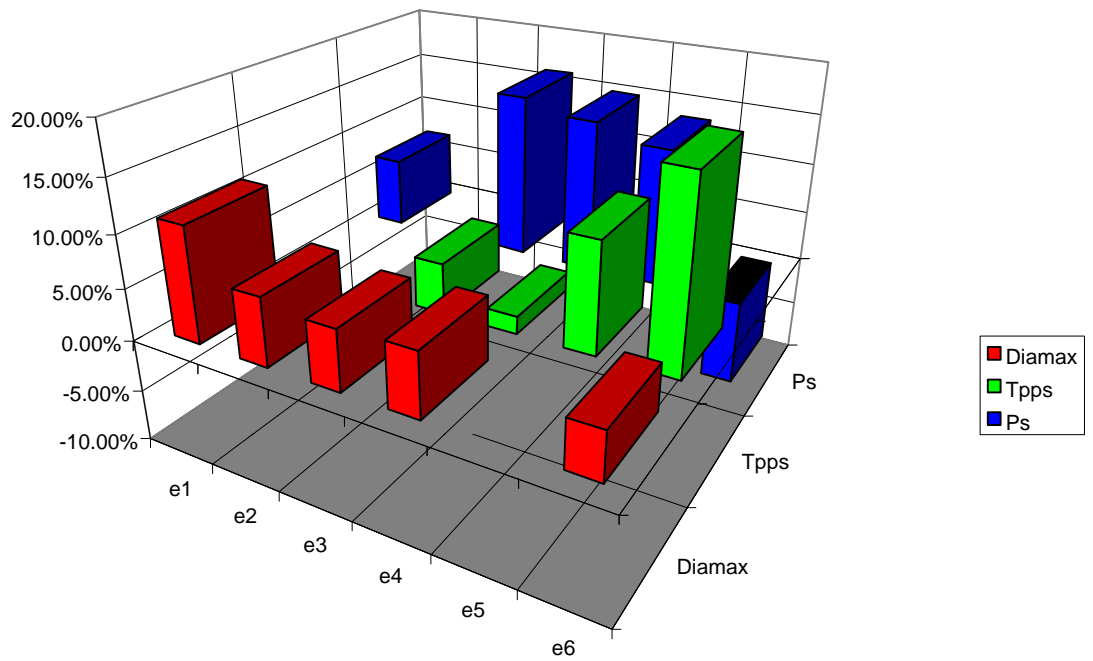


Figure 11. Les tendances des coefficients de variation suivies pour quelques paramètres au cours des expériences.

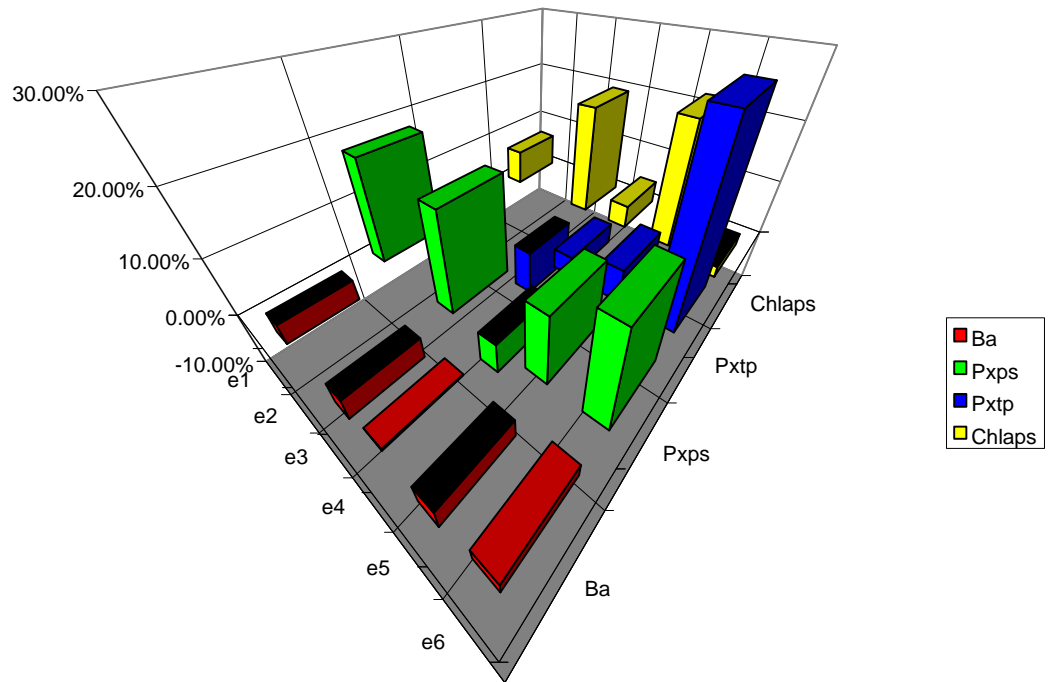


Figure 12. Les tendances des coefficients de variation suivies pour les paramètres biochimiques au cours des expériences.

Il est difficile d'établir la dépendance des réponses observées (voir les graphiques ci-dessus) des valeurs de la pollution. En effet, nous ne connaissons que les concentrations d'O₃, de NO₂ et de SO₂. Les conditions expérimentales sont différentes de celles des essais de fumigation avec plusieurs concentrations; les données sont donc insuffisantes pour effectuer une analyse de régression. Nous pouvons toutefois résumer la réaction des paramètres qui nous semblent le mieux corrélés à la pollution atmosphérique (Tableau 9).

	O ₃ , ng/m ³	NO ₂ , ng/m ³	SO ₂ , ng/m ³	GRsp, Différence du coef. variation	PS, Différence de la moyenne	Chl a sp., Différence de la moyenne	B/A, Différence de la moyenne
e1	40.1	37.1	13.5	non mesuré	-23%	12%	-16%
e2	63.7	29.3	11.0	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré
e3	73.8	21.9	7.7	4.02%	ns	ns	0%
e4	65.5	21.8	7.6	ns	ns	ns	0%
e5	71.2	19.9	3.9	35.89%	-36%	17%	0%
e6	67.9	16.7	3.6	28.51%	-42%	62%	5%

Tableau 9. Valeurs moyennes de la pollution atmosphérique (cf. Figure 4. Les valeurs de la pollution atmosphérique au cours des expériences. Les moyennes sont calculées à partir des valeurs semi-horaires mesurées par le système DOAS depuis le début de l'exposition jusqu'au prélèvement) et la réponse de quelques paramètres. La différence de la moyenne entre les plantes traitées et témoins est rapportée aux témoins (cf. note 3); seules les valeurs significatives sont présentées.

3.8 Corrélations

Une analyse de corrélation entre les paramètres a été effectuée sur l'ensemble des données, ainsi que sur les données de chaque expérience. Les corrélations ne sont tout de même pas régulières pour tous les paramètres. On constate que les mesures les plus corrélées entre elles sont les concentrations de chlorophylles (a et b) et mesures (PS et PF, DIAMAX et SURFACE, LARGEUR et LIMBE, PF et SURFACE, PS et SURFACE).

	<i>Echantillon: TEMOIN</i>	<i>Echantillon: TRAITE</i>
LARGEUR LIMBE	0.821	0.799
DIAMAX SURFACE	0.926	0.903
PF SURFACE	0.859	0.919
PS PF	0.946	0.919
PS SURFACE	0.887	0.836
PXsp PXtp	0.812	0.818
GRsp PXtp	0.852	0.708
PXsp GRsp	0.583	0.497
PXtp GRtp	0.624	0.575
Chl a sp. Chl b sp.	0.92	0.986

Tableau 10. Corrélations pour toutes les expériences, $p < 0.01$

Nous ne voyons toutefois pas de raisons particulières d'abandonner certaines des mesures quoique leur volume rende le travail sur un grand nombre de plantes fastidieux. La différence de la réaction de PXsp, PXtp, GRsp et GRtp pourrait s'accroître ou diminuer selon les conditions de croissance et apporter ainsi des informations complémentaires. Le rapport B/A serait impossible à estimer si l'on n'étudie que la réaction d'une des chlorophylles.

4. Discussion

Dispositif expérimental

Le déroulement des expériences, ainsi que les mesures supplémentaires, a démontré que le dispositif est bien approprié à l'étude de l'action de la pollution atmosphérique sur un végétal. Néanmoins, nous nous sommes rendu compte de quelques problèmes techniques qui se sont imposés au cours de nos expériences:

- La technique de contrôle de température s'est révélée mal adaptée aux incubateurs. Installés dans un local climatisé, les incubateurs maintiennent leur température d'environ 22°. L'air ambiant qui passe à travers les pompes et le système de tuyauterie change sa température initiale. Pendant la période fraîche, il arrive dans les incubateurs avec une température de 17-19°. L'éclairage réchauffe les

incubateurs de 3-5°. Ainsi, on obtient les conditions de croissance optimales pour *Arabidopsis thaliana*. Or, pendant la saison estivale, les températures de l'air ambiant oscillent autour de 26°. Il n'est donc pas surprenant que l'air qui entre dans les incubateurs ait une température de 23-30°. L'échange de chaleur se fait par les fonds des incubateurs. La ventilation étant forte (8-9 l/min., l'air se renouvelle dans les incubateurs chaque 10-15 min.), il est impossible d'éviter que les plantes subissent un effet défavorable des températures élevées. Une amélioration possible du dispositif serait de contrôler la température de l'air avant son entrée dans les incubateurs à l'aide d'un échangeur de chaleur. Ce dernier devrait avoir une surface d'échange importante et être complètement inerte. Le Téflon ayant une grande inertie calorifique, l'acier inox pourrait convenir à cet usage. Ceci entraînerait, sans doute, d'importants investissements.

- Le terreau utilisé comme support pour la croissance des plantes ne répond guère à nos exigences. Il est peu homogène et sa qualité peut varier de lot en lot. De plus, il n'est pas stérile ce qui augmente le risque de contamination par des bactéries, des algues, des champignons et des moucheron. Il serait préférable d'adapter un milieu artificiel inerte (vermiculite, par exemple) à la croissance d'*Arabidopsis thaliana*. Si cette décision est prise, la première expérience à faire serait d'établir si la variabilité au sein de l'échantillon cultivé sur ce milieu est inférieure à celle de l'échantillon cultivé sur le terreau à cactus. Dans ce cas, l'utilisation de ce milieu serait avantageux.

Paramètres biométriques

	e1 μ	e1 Cv	e2 μ	e2 Cv	e3 μ	e3 Cv	e4 μ	e4 Cv	e5 μ	e5 Cv	e6 μ	e6 Cv
Pétiole					↑↑	↑↑	ns	ns			ns	ns
Limbe					↓	ns	↓	↑↑			↓	ns
Largeur							ns	↑↑			↓	ns
L/P					↓	ns	↓	↑↑			↓	ns
Surface							↓	↑↑			↓	ns
Diamax	↓	↑↑	ns	↑↑	ns	ns	ns	↑↑			↓	ns
PF	↓	ns	ns	↑↑	ns	ns	ns	ns				
PS	↓	ns			ns	↑↑	ns	ns	↓	↑↑	↓	ns

Tableau 11. Résumé des différences significatives ($p < 0.05$) entre les plantes témoins et traitées (cf. Tableau 3-Tableau 8). Signes: **Y** supérieur chez les plantes traitées; **B** inférieur chez les plantes traitées; ns - non-significatif; cellules vides - non mesuré; m - moyenne; Cv - coefficient de variation

Il est manifeste que les plantes soumises à la pollution atmosphérique présentent une diminution du taux de croissance. En effet, d'après les mesures directes et les calculs auxiliaires (le rapport L/P), le poids frais et sec, le diamètre de la rosette, la surface foliaire ont tendance à la diminution. La variabilité de tous ces paramètres a une

tendance assez prononcée à une augmentation au sein de l'échantillon traité. Afin de mesurer cette variabilité, il est important de se référer au coefficient de variation. L'utilisation des tests de comparaison des variances, bien que plus précis, peut conduire à des conclusions erronées. D'un autre côté, ces tests seraient utiles dans le cas où aucun changement de la tendance centrale n'est observé.

La différence entre les échantillons traité et témoin montre une certaine tendance à l'augmentation au cours de la saison. Nous ne disposons pas d'assez d'information pour corrélérer ce phénomène au total de la pollution atmosphérique. L'effet de l'augmentation de la concentration d'O₃ pourrait d'ailleurs en être la cause principale [Braun et Flückiger 1995].

Nous pouvons constater que les paramètres biométriques ne réagissent pas instantanément à la pollution atmosphérique et peuvent indiquer l'effet de la dose cumulative au cours de toute l'expérience.

Paramètres biochimiques

	e1 μ	e1 Cv	e2 μ	e2 Cv	e3 μ	e3 Cv	e4 μ	e4 Cv	e5 μ	e5 Cv	e6 μ	e6 Cv
TPPS					ns	ns	↑↑	ns	↑↑	↑↑	ns	↑↑
PXsp	↓	ns			↑↑	ns	ns	ns	↑↑	ns	ns	ns
PXtp					↑↑	ns	ns	ns	↑↑	ns	ns	ns
GRsp					↑↑	↑↑	ns	ns	↑↑	↑↑	ns	↑↑
GRtp					↑↑	↓	ns	ns	ns	↑↑	↑↑	↑↑
Chl a sp	↑↑	ns			↑↑	↑↑	ns	ns	↑↑	↑↑	↑↑	ns
Chl b sp	ns	ns			↑↑	↑↑	ns	ns	↑↑	↑↑	↑↑	ns
B/A	↓	↓			↓	↓	=	ns	=	↓	↑↑	ns

Tableau 12. Résumé des différences significatives ($p < 0.05$) entre les plantes témoins et traitées (cf. Tableau 3-Tableau 8). Signes: **Y** supérieur chez les plantes traitées; **I** inférieur chez les plantes traitées; = aucune différence; ns - non-significatif; cellules vides - non mesuré; m - moyenne; Cv - coefficient de variation

Il est important de noter qu'aucun dégât visible n'a été observé au cours de nos expériences. En effet, les valeurs limites des concentrations des polluants majeurs (SO₂, NO_x) n'ont été dépassées que rarement ou pendant une période limitée (O₃, en été).

Aucune conclusion fiable ne peut être donnée sur la tendance centrale de TPPS; les valeurs plus élevées sont toutefois plus fréquentes chez les plantes traitées.

C'est avec une certaine précaution que nous pouvons tirer une conclusion sur les activités de la peroxydase et de la glutathion réductase. En effet, il n'est pas encore établi si le manque d'une tendance claire dans les expériences e4 et e6 est dû aux manipulations avant la congélation. Tout de même nous pouvons affirmer qu'une

augmentation de l'activité de la peroxydase et de la glutathion réductase peut être observée si les plantes sont soumises au stress oxydatif créé par la pollution atmosphérique. Il est d'ailleurs possible que l'instabilité de la réponse soit expliquée par la sensibilité de ces enzymes à la pollution atmosphérique et par la rapidité avec laquelle elles répondent à ce stress [Castillo 1992]. On observe également une augmentation de la variabilité de ces paramètres chez les plantes traitées encore que la variabilité de l'activité par rapport à la concentration totale de protéines solubles puisse montrer une réaction inverse.

L'interprétation de la réaction des concentrations de chlorophylles est aussi controversée. Une bonne corrélation positive entre les concentrations de chlorophylles et la pollution atmosphérique totale a été déjà rapportée [Arb et al. 1990]. Ceci confirme nos observations concernant l'augmentation du taux des chlorophylles. Il est possible également que seul NO₂ contribue à l'augmentation des concentrations de chlorophylles grâce à ses effets nutritifs. Cette possibilité n'est pas soutenue par nos résultats. En effet, l'augmentation des concentrations de chlorophylles s'accroît bien que le niveau de NO₂ baisse au cours de nos expériences. Au contraire, il est connu que de hautes concentrations d'O₃ peuvent avoir l'effet inverse; il est cependant probable que ce phénomène n'ait lieu qu'après l'apparition des dégâts visibles. En revanche, l'augmentation de la concentration d'O₃ au cours de nos expériences peut expliquer l'augmentation du rapport B/A. Ce polluant peut avoir un effet destructif plus important sur la chlorophylle *a* et/ou sur sa synthèse *de novo* que sur la chlorophylle *b* [Knudson et al. 1977]. Une série d'expériences au cours de toute l'année pourrait apporter plus d'information de façon à étudier ces tendances plus profondément. Une étude ultérieure des effets individuels de chaque polluant sur les concentrations de chlorophylles et leur rapport serait également utile. De même, à l'heure actuelle, nous ignorons quel est le temps de réaction de la teneur en chlorophylles sous l'effet de la pollution atmosphérique.

Effet sur la structure de la population

Mis à part l'effet de la pollution atmosphérique sur la tendance centrale de la réaction de la population, nous constatons un effet considérable sur la structure de la population, et notamment sur sa variabilité dont le coefficient de variation est la meilleure estimation. Ceci s'accorde bien avec les recherches effectuées sur ce sujet [Arb et al. 1990, Colemann et Mooney 1990].

En effet, comme les plantes n'avaient jamais été soumises à des polluants atmosphériques, la variabilité accrue peut être due aux différences de sensibilité génétique (l'expression des mutations cachées, par exemple) des plantes aux polluants atmosphériques. Ces différences ne se seraient pas exprimées dans des conditions d'air non-pollué. Nous pouvons prédire que l'exposition continue des plantes qui n'avaient jamais été exposées à la pollution atmosphérique entraînera une augmentation initiale de la variabilité de leur réponse (paramètres biométriques, activité enzymatique, teneur en pigments etc.) et que cette variabilité se réduira dans les générations suivantes à cause de la force sélective imposée par ce facteur. Par contre, les différences de la température et de la nutrition ne devraient pas induire de différences de variabilité (quoiqu'elles influencent sensiblement la tendance centrale) car ce sont des forces sélectives imposées sur les plantes tout au long de leur évolution. Donc, les études sur la tendance centrale ou la variabilité seule ne seraient pas complètes.

Nous avons constaté que plus de paramètres sont distribués anormalement et que le degré d'asymétrie dans la majorité des cas est plus élevé chez les plantes traitées. Ces observations ne sont pourtant ni régulières ni statistiquement prouvées et donc non concluantes.

En général, les conditions expérimentales se sont conformées aux conditions requises des tests statistiques. Il existe toutefois des possibilités d'augmenter leur sensibilité et leur robustesse. Il ne s'agit pas d'augmenter l'effectif des échantillons (cf. paragraphe 1.4) mais de diminuer la variabilité résiduelle (la variabilité qui n'est pas due à l'effet du traitement). Ceci implique de réduire les fluctuations des conditions expérimentales (la température, la nutrition, la luminosité, la distribution de l'air dans les incubateurs, le milieu de croissance) au minimum. Le terreau et le contrôle de température seraient en tête de la liste des modifications éventuelles. De plus, tant que ces paramètres ne seront pas complètement maîtrisés, il serait nécessaire de multiplier les mesures en ajoutant un témoin à chaque traitement, à chaque site et à chaque nouvel incubateur introduit dans les expériences.

5. Conclusions

Nous avons élaboré le dispositif pour les études de l'action de la pollution atmosphérique sur des populations d'*Arabidopsis thaliana* qui se conforme aux conditions requises. Un nombre d'expériences ont été effectuées qui nous permettent de mettre en évidence la réaction d'une plante individuelle, ainsi que celle d'un échantillon de la population, à la pollution atmosphérique. Au niveau d'une plante moyenne, elle se compose principalement d'une diminution du taux de croissance, d'une augmentation de l'activité des enzymes de la protection contre le stress oxydatif, d'une augmentation des concentrations de chlorophylles a, b et de changements de leur rapport B/A. Au niveau de la population, une nette augmentation de la variabilité s'est avérée induite par le stress de pollution. Nous supposons que la distribution est également affectée; elle s'avère anormale plus fréquemment chez les plantes stressées.

Une évolution de la pollution atmosphérique a été observée au cours des expériences en février - juin 1995. On peut supposer que la qualité de l'air s'est détériorée ce qui a été provoqué par une augmentation du taux en ozone.

La recherche se tourne maintenant vers l'exploitation d'autres sites d'application du système mis au point en ville de Lausanne. Une autre expérience est déjà en cours dans un local à César Roux (voir la carte, p.17). En même temps, les modifications nécessaires sont proposées pour affiner le dispositif utilisé. Quant à la méthodologie, il est possible d'enrichir ou simplifier les analyses existantes selon l'objectif précis de l'étude. Nous proposons les stratégies suivantes:

- Si l'analyse s'effectue sur plusieurs sites simultanément et qu'il faut par conséquent diminuer le volume de travail, il est possible de réduire les analyses aux mesures du poids sec, de l'activité peroxydasique et des chlorophylles *a* et *b*. L'ensemble de ces paramètres est déjà un bon indicateur de la pollution atmosphérique.
- Par contre, s'il s'agit d'approfondir la connaissance de l'action d'un stress sur les végétaux ou d'améliorer la performance du système de surveillance de la pollution

atmosphérique, il est possible d'adapter et d'ajouter d'autres techniques à celles qui sont déjà mises au point. Ce seraient:

- l'application d'appareils de mesure de fluorescence de la chlorophylle. Cette technique est extrêmement rapide et précise ce qui permet de travailler avec un grand nombre de plantes. L'analyse de l'induction de la fluorescence (effet Kautski) permettrait d'établir l'action de la pollution atmosphérique sur l'appareil photosynthétique, ce qui constitue un bon indicateur de l'état métabolique de la plante.
- les mesures des activités d'autres enzymes qui peuvent être induites par la pollution atmosphérique.
- l'analyse de l'expression des gènes codants pour les enzymes qui est induite par la pollution atmosphérique. La technique "northern blot" peut être associée avec celle de "tissue print" pour permettre d'étudier l'ensemble d'un échantillon. La réaction au niveau de la transcription peut être beaucoup plus sensible que celle observée au niveau enzymatique. Dans cette perspective, nous possédons déjà les sondes d'ADN pour SOD, GST, PAL et peroxydases.
- les études de la réaction de différents écotypes d'*Arabidopsis thaliana*. Avec l'analyse de plusieurs générations, ceci représenterait une autre recherche complexe qui s'accentuerait sur les changements de la population exposée à la force sélective d'un stress.

Il est à remarquer que le dispositif élaboré peut aussi bien servir à effectuer les essais de fumigation avec des polluants individuels ou en différentes combinaisons.

6. Bibliographie

- Arb, C. V. and Brunold, C. 1990. Lichen physiology and air pollution. I. Physiological responses of in situ *Parmelia sulcata* among air pollution zones within Biel, Switzerland. *Canadian J. of Botany* 68, 37-52.
- Arb, C. V., Müller, C., Ammann, C. and Brunold, C. 1990. Lichen physiology and air pollution. II. Statistical analysis of the correlation between SO₂, NO₂, NO and O₃, and chlorophyll content, net photosynthesis, sulphate uptake and protein synthesis of *Parmelia sulcata* Taylor. *New Phytology* 115, 431-437.
- Baehler, W. 1987. Pollution atmosphérique en Suisse romande. *Pollution Atmosphérique* juillet-septembre, 258-260.
- Bahl, A. and Kahl, G. 1995. Air pollutant stress changes the steady state transcript level of the three photosynthesis genes. *Environmental pollution* 88, 57-65.
- Bahl, A., Loitsch, S. M. and Kahl, G. 1995. Transcriptional activation of plant defence genes by short term air pollutant stress. *Environmental Pollution* 89, 221-227.
- Bender, J., Weigel, H. J., Wegner, U. and Jäger, H. J. 1994. Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environmental Pollution* 84, 15-21.
- Bergmeyer, H. U., Ed. 1986. *Methods of enzymatic analysis*.
- Bowler, C., Montagu, M. V. and Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83-116.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Braun, S. and Flückiger, W. 1995. Effects of ambient ozone on seedlings of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytology* January,
- Bremer P., Crettenand, F., Hadorn, J.-Ch., Lehmann, P. 1992. *Projet POLCA. Résumé du rapport scientifique. SEDE S.A.*
- Brown, M. B. and Forsythe, A. B. 1974. Robust test for the equality of variances. *J. of the American Statistical Association*. 69, 364-367.
- Casano, L. M., Martín, M. and Sabater, B. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiology* 106, 1033-1039.
- Castillo, F. J. 1992. Peroxidases and stress. In : *Plant peroxidases 1980-1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects*. C. Penel, T. Gaspar and H. Greppin (Ed.). Geneva, pp. 187-203.

- Coleman, J. S. and Mooney, H. A. 1990. Anthropogenic stress and natural selection : variability in radish biomass accumulation increases with increasing SO₂ dose. *Canadian J. of Botany* 68, 102-106.
- Cotrufo, M. F. and De Santo, A. V. 1995. Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in *Quercus ilex* L. woods. *Environmental Pollution* 89, 87.
- Ekeberg, D., Jablonska, A. M. and Ogner, G. 1995. Phytol as a possible indicator of ozone stress by *Picea abies*. *Environmental Pollution* 89, 55-58.
- Flückiger, J.-M. 1992. Quelques effets de l'ozone sur la croissance du maïs. Thesis, University of Lausanne
- Gerbling, K.-P., Kelly, G. J., K.-H., F. and Latzko, E. 1984. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. *J. of Plant Physiology* 115, 59-67.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathion S-transferases. *J. of Biological Chemistry* 249, 7131-7139.
- Heller, R. 1968. Manuel de statistique biologique. Gauthier-Villars.
- Hindges, R. and Slusarenko, A. 1992. cDNA and derived amino acid sequence of a cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Molecular Biology* 18, 123-125.
- Holopainen, J. K., Braun, S. and Flückiger, W. 1994. The response of spruce shoot aphid *Cinara pilicornis* hartig to ambient and filtered air at two elevations and pollution climates. *Environmental Pollution* 86, 233-238.
- Janakiraman, R. and Harney, P. M. 1975. Effect of ozone on *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* 12, 4-5.
- Kilian, A. and Maluszynski, M. 1987. Genetic variability of *Arabidopsis thaliana* populations from regions of different pollution level.
- Kilian, A. and Rostanski, A. Analysis of the variability of natural *Arabidopsis thaliana* populations in Poland. 77-86.
- Klumpp, A., Klumpp, G. and Domingos, M. 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra Do Mar near the industrial complex of Cubatao, Brazil. *Environmental Pollution* 85, 109-116.
- Knudson, L. L., Tibbitts, T. W. and Edwards, G. E. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant physiology* 60, 606-608.
- Krause, G.H., Weis, E. 1983. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 4, 139-157
- Lande, R. 1980. On comparing coefficients of variation. *Systematic Zoology* 29, 214-217.
- May, M. J. and Leaver, C. J. 1993. Oxidative stimulation of glutathion synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* 103, 621-627.

- Owens, W. I. and Belcher, R. V. 1964. Glutathion and thiols microdeteremination. *Biochemical journal* 94, 705-711.
- Rennenberg, H. 1982. Glutathion metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21, 2771-2781.
- Schulte-Hostede, S., Darrall, N. M., Blank, L. W. and Wellburn, A. R., Ed. 1988. Air pollution and plant metabolism. Elsevier Applied Science Ltd.
- Scotti, A., Silva, S. and Botteschi, G. 1994. Effects of ozone on grain quality of wheat grown in open-top chambers : three years of experimentation. *Environmental Pollution* 86, 31-35.
- Sharma, Y. K. and Davis, K. R. 1994. Ozone induced expression of stress related genes in *A. thaliana*. *Plant physiology* 105, 1089-1096.
- Schreiber, U. 1983. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. The measuring system. *Photosynthesis Research* 4, 361-373
- Sokal, R.R and Braumann, C.A. 1980. Significance tests for coefficients of variation and variability profiles. *Systematic Zoology* 29, 50-66
- Treshow, M. and Anderson, F. K. 1989. Plant stress from air pollution. John Wiley & Sons.
- Urech, M., Herzig, R., Liebendörfer, L. and Ammann, K., Ed. Flechten als Bioindikatoren der Luftverschmutzung in der Region Biel-Seeland : Kalibrierte Flechtenindikationsmethode und Passives Biomonitoring. Biel - Klima und Luftverschmutzung einer Schweizer Stadt. Bern und Stuttgart, Paul Haupt.
- Willekens, H., Camp, W. v., Montagu, M. v., Inzé, D., Langebartels, C. and Sandermann, H. J. 1994. Ozone, sulphur dioxide and UV B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotina plumbaginifolia* L. *Plant Physiology* 106, 1007-1014.
- Wingsle, G., Mattson, A., Ekblad, A., Hällgren, J.-E. and Selstam, E. Changes in levels of lipids and pigments without effects on glutathion reductase and superoxide dismutase in *Pinus Sylvestris* L. seedlings due to ozone exposure.
- Woodbury, P. B., J.A., L. and Hudler, G. W. 1994. Chronic ozone exposure alters the growth of leaves, stems and roots of hybrid *Populus*. *Environmental Pollution* 85, 103-108.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Inc.
- Zrýd, J.-P. 1993. Surveillance biologique de la pollution atmosphérique en ville de Lausanne. Laboratoire de Phytogénétique Cellulaire, Université de Lausanne.

7. Liste des abréviations

Abréviation	Signification	Référence
COV	composés organiques volatils	
DOAS	système de mesure Differential Optic Absorbtion Spectrometry	page 16
PAN	peroxyacétyl nitrate	
PAL	phénylalanine ammonia-lyase	
SOD	superoxyde dismutase	
GR	glutathion réductase	
GRsp	activité de la glutathione réductase par rapport au poids sec	page 20
GRtp	activité de la glutathione réductase par rapport à la concentration totale de protéines solubles	page 20
PX	peroxydase	
PXsp	activité de la peroxydase par rapport au poids sec	page 20
PXtp	activité de la peroxydase par rapport à la concentration totale de protéines solubles	page 20
GST	glutathione S-transférase	
APx	ascorbate peroxydase	
GPx	glutathione peroxydase	
TPPS	concentration totale de protéines solubles	page 20
PF	poids frais	page 19
PS	poids sec	page 19
Chl a sp	concentration de chlorophylle a par rapport au poids sec	page 21
Chl b sp	concentration de chlorophylle b par rapport au poids sec	page 21
BA	rapport des teneurs en chlorophylles b/a	page 21
L/P	rapport des longueurs de limbe et pétiole de la feuille maximale de la rosette	page 19
DIAMAX	longueur de la feuille maximale de la rosette	page 19
ns	non-significatif	page 10
C.variation Coef. variation	Coefficient de variation	page 10, 22