



**HAL**  
open science

# Étude de l'assimilation de carbone par le compartiment ligneux aérien de l'arbre

Daniel Berveiller

► **To cite this version:**

Daniel Berveiller. Étude de l'assimilation de carbone par le compartiment ligneux aérien de l'arbre. Sciences de l'environnement. Université Paris-Sud, 2008. Français. NNT : 2008PA112171 . tel-03990968

**HAL Id: tel-03990968**

**<https://hal.science/tel-03990968v1>**

Submitted on 15 Feb 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

N° D'ORDRE



## THÈSE DE DOCTORAT

SPECIALITE : SCIENCES DE LA VIE  
*Ecole Doctorale «ED 145 - Sciences du Végétal »*

Présentée par :  
**Daniel BERVEILLER**

---

# ETUDE DE L'ASSIMILATION DE CARBONE PAR LE COMPARTIMENT LIGNEUX AERIEN DE L'ARBRE

---

Soutenue le 23 octobre 2008 devant les membres du jury :

Pierre	DIZENGREMEL	<i>Pr. Univ. Nancy I</i>	Rapporteur
Thierry	AMEGLIO	<i>DR INRA</i>	Rapporteur
Paul	LEADLEY	<i>Pr. Univ. Paris-Sud</i>	Président du jury
Michael	STAUDT	<i>CR CNRS</i>	Examineur
Claire	DAMESIN	<i>Pr. Univ. Paris-Sud</i>	Directrice de thèse



# ***REMERCIEMENTS***

---



*Quelques mois avant mon arrivée à l'ESE en 2002 pour le poste d'ingénieur que j'occupe, je passais au laboratoire pour visiter mes futurs locaux et discuter avec les responsables du laboratoire. Ma visite avait aussi pour but de faire savoir mon souhait de réaliser une thèse de Doctorat tout en assurant mes fonctions d'aide à la recherche. Il est donc tout naturel que je remercie ici Pierre-Henri Gouyon et Paul Leadley, respectivement ancien et actuel directeurs de l'UMR Ecologie, Systématique et Evolution (ESE), Eric Dufrière, responsable du département Ecophysiologie Végétale et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) pour m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse.*

*Merci à Michel Dron, Directeur de l'Ecole Doctorale, pour m'avoir également permis de réaliser cette thèse au sein de l'Ecole Doctorale SDV.*

*Merci à Claire Damesin, ma directrice de thèse, pour m'avoir encadrer au cours de ces trois années de thèse. Elle a toujours su trouver du temps à m'accorder dans son planning rempli d'enseignements, de réunions, de réunions, et ...de réunions.*

*Je dois évidemment remercier tous mes collègues pour ne pas m'avoir surchargé de travail pendant ces trois années de thèse : Jean-Yves, Laurent, Marie-Claire (elle est indispensable)... Au contraire, ils ont toujours pu libérer un peu de leur temps pour m'aider lorsque j'en ai eu besoin. Merci beaucoup à tous !*

*Il y aussi Jeril Degrouard et Danielle Jaillard, au Centre Commun de Microscopie Electronique, qui m'ont appris tous les rudiments de la microscopie électronique, depuis la préparation des échantillons (dis donc, comme c'est long !) jusqu'à l'observation (oh, comme c'est beau !). Merci à Suzanne Boltès, de la plateforme d'Imagerie de l'IFR87 et à Anne Fleury-Aubusson, du laboratoire Développement et Evolution de l'IBAIC, qui ont ajouté de la couleur via la microscopie confocale ou à épifluorescence (oh, c'est encore plus beau !).*

*Merci à Jean Vidal pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors des manip sur la PEPC. Nos discussions ont été très enrichissantes et pleines de conseil. C'est également à cette occasion que j'ai rencontré Jean-Noël Pierre qui m'a encadré lors de la mise au point des Western Blot, avant son départ à la retraite. Jean-Noël, tu es quelqu'un d'organisé et d'ordonné... ce sont des qualités que j'apprécie beaucoup. Merci également aussi à Françoise Ambart-Bretteville pour m'avoir aidé dans les techniques d'électrophorèse.*

*J'en profite aussi pour remercier Nathalie Frascaria, Daniel Epron, Jean-Noël Pierre et Jean Vidal qui ont accepté de faire parti de mon comité de thèse.*

*Enfin, un petit coucou aux nombreux stagiaires et doctorants que j'ai côtoyés depuis mon arrivée au laboratoire.*

*Encore merci à tous ...*



## ABREVIATIONS :

- ATP : adénosine triphosphate  
ETR : vitesse de transport d'électron  
 $F_v/F_m$  : rendement quantique maximum des centres réactionnels des PSII  
 $F_v'/F_m'$  : rendement quantique opérationnel des centres réactionnels des PSII  
NPQ : quenching non photochimique  
PEP : phosphoenolpyruvate  
PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase  
PSI : photosystème I  
PSII : photosystème II  
qP : quenching photochimique  
Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase  
 $\phi_{PSII}$  : rendement quantique de la photochimie au niveau du PSII  
NADP ME : enzyme malique à NADP  
PPFD : densité de flux de photon dans le PAR  
PAR : radiations photosynthétiquement actives





# TABLE DES MATIERES :

<b>I)</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
	<b>A. Contexte général.....</b>	<b>2</b>
	<b>B. La tige dans la gestion du carbone de l'arbre.....</b>	<b>5</b>
	<b>1) Transport et stockage du carbone assimilé.....</b>	<b>5</b>
	a) Transport des photosynthétats foliaires.....	5
	b) Stockage et gestion des réserves carbonées .....	5
	b.1) Nature et localisation.....	5
	b.2) Dynamique saisonnière et interannuelle .....	6
	<b>2) La respiration des organes ligneux aériens .....</b>	<b>7</b>
	a) Variabilité de la respiration.....	7
	a.1) Variabilité temporelle .....	7
	a.2) Variabilité spatiale.....	8
	b) Respiration = efflux de CO <sub>2</sub> ?.....	8
	b.1) Concentrations de CO <sub>2</sub> dans la tige. ....	8
	b.2) Flux de CO <sub>2</sub> dans et à travers la tige.....	10
	• Efflux de CO <sub>2</sub> .....	10
	• Flux verticaux de CO <sub>2</sub> .....	10
	<b>C. La tige : organe photosynthétique .....</b>	<b>13</b>
	<b>1) La tige et la ressource lumineuse .....</b>	<b>13</b>
	a) Présence de cellules chlorophylliennes dans la tige.....	13
	a.1) Contenu en chlorophylle.....	13
	a.2) Ultrastructure des chloroplastes et distribution de la chlorophylle dans la tige .....	14
	b) La lumière dans la tige.....	14
	b.1) Pénétration et qualité de la lumière dans la tige .....	15
	b.2) Quantité de lumière .....	16
	<b>2) Ecophysiologie de la photosynthèse des tiges .....</b>	<b>17</b>
	a) Réponses aux conditions environnementales.....	17
	a.1) Réponse à la lumière.....	17
	a.2) Réponse à la température.....	18
	b) Photochimie.....	18
	c) Assimilation de CO <sub>2</sub> par la photosynthèse des tiges : réalité ou fiction ? .....	20
	c.1) Refixation de CO <sub>2</sub> par la photosynthèse des tiges .....	20
	c.2) Processus potentiellement impliqués dans la réponse de la photosynthèse des tiges à la lumière.....	21
	• Photorespiration .....	21
	• Inhibition de la respiration à la lumière .....	21
	<b>D. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>23</b>
<b>II)</b>	<b>COMPARAISON INTERSPECIFIQUE DE LA PHOTOSYNTHESE DES TIGES.....</b>	<b>25</b>
	Présentation .....	26
	Principaux résultats .....	27
	Article : Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species .....	29
<b>III)</b>	<b>CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET VARIATIONS SAISONNIERES DE LA PHOTOSYNTHESE DES TIGES.....</b>	<b>39</b>
	Présentation .....	40
	Principaux résultats .....	41
	Article : Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase .....	43

<b>IV) LA PEPC DES TIGES DE L'ARBRE : UNE IMPLICATION POSSIBLE DANS UN METABOLISME C<sub>4</sub> ? .....</b>	<b>53</b>
Présentation .....	54
Aspects techniques .....	55
Principaux résultats .....	56
Article : Tree stem phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC): lack of biochemical and localization evidence for a C <sub>4</sub> -like photosynthesis system.....	58
<b>V) IMPACT D'UN APPORT D'AZOTE SUR L'ASSIMILATION DE CARBONE PAR LA TIGE.....</b>	<b>66</b>
Présentation .....	67
Principaux résultats .....	68
Article : Effect of varied soil nitrogen supply on the carbon assimilation by tree stems .....	70
<b>VI) DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>86</b>
Comparaison de la photosynthèse des tiges et des feuilles .....	87
Aspects écologiques et évolutifs de la photosynthèse des tiges.....	89
Source et devenir du carbone assimilé par la tige ligneuse.....	90
Conclusion .....	92
<b>VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>94</b>
<b>VIII) ANNEXES.....</b>	<b>106</b>

## TABLES DES ILLUSTRATIONS :

### Equations :

<b>Equation 1</b> : expression de la respiration en fonction de la température.....	7
<b>Equation 2</b> : relation entre l'efflux de CO <sub>2</sub> de la tige et la diffusion du CO <sub>2</sub> à travers l'écorce.....	10
<b>Equation 3</b> : équation permettant le calcul de l'assimilation brute appelée A <sub>g</sub> ou P <sub>g</sub> .....	17
<b>Equation 4</b> : équation permettant le calcul du pourcentage de refixation.....	20

### Figures :

<b>Figure 1</b> : évolution du nombre d'articles publiés sur la photosynthèse des tiges des arbres depuis 1875, représentée par classes de cinq années. Chaque couleur correspond à un thème de recherche donné. ....	2
<b>Figure 2</b> : schémas de (A) la structure et de l'anatomie de tige, (B) des vaisseaux de xylème et de phloème, et (C) coupe transversale de tige de l'année de hêtre ( <i>Fagus sylvatica</i> L.), observée sous microscope optique. Barre = 700 µm. Image A : d'après <a href="http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/105F00_8.html">http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/105F00_8.html</a> , Image B : d'après <a href="http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/biology/greenplantsasorganisms/1watertransportrev3.shtml">http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/biology/greenplantsasorganisms/1watertransportrev3.shtml</a> Image C : photographie réalisée au cours de cette thèse .....	4
<b>Figure 3</b> : variation saisonnière du contenu en amidon des feuilles, des tiges de l'année (2000) et tiges d'un an (1999) de hêtre ( <i>Fagus sylvatica</i> L.). Les points représentent les moyennes (± 1 erreur standard). D'après Damesin & Lelarge (2003). ....	6
<b>Figure 4</b> : concentrations en CO <sub>2</sub> ([CO <sub>2</sub> ] <sub>g</sub> , en %) dans la phase gazeuse, et concentrations (en mmol l <sup>-1</sup> ) et proportions (en %) des différentes formes dissoutes de carbone ([CO <sub>2</sub> ] <sub>aq</sub> , [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] et CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) dans la feuille, l'écorce et le bois, calculées aux pH moyens représentatifs du tissu (ou de l'organe considéré) et à 25°C. [CO <sub>2</sub> *] représente la concentration en CO <sub>2</sub> dissout total ([CO <sub>2</sub> ] <sub>aq</sub> + [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] + CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ). ....	10
<b>Figure 5</b> : représentation schématique des flux de CO <sub>2</sub> dans et à travers la tige. La partie interne de l'écorce (1), le cambium (2) et les rayons ligneux du bois (3) sont les sources principales de CO <sub>2</sub> . Une partie du CO <sub>2</sub> est dégagée vers l'extérieur et une autre est dissoute dans la sève. Plus haut dans la tige, le CO <sub>2</sub> ayant été en partie emporté par le flux xylémien est dégagé (4). La refixation de CO <sub>2</sub> a principalement lieu dans le parenchyme cortical. D'après Teskey et al. (2008). ....	11
<b>Figure 6</b> : variabilité interspécifique de la quantité de chlorophylle contenue dans l'écorce de jeunes tiges d'arbres bien exposées. Les chiffres entre parenthèses indiquent la gamme d'âge représentée en années. D'après Pfanz et al. (2002). ....	13
<b>Figure 7</b> : spectres d'absorption des chlorophylles a et b extraits de feuilles. D'après Buchanan et al. (2002). .	15
<b>Figure 8</b> : comparaison schématique des structures d'une tige et d'une feuille. Une petite partie de la lumière incidente (flèche jaune) est réfléchi au niveau du suber ou de l'épiderme (flèche bleu) et une grande partie est absorbée par les tissus (flèche orange) et éventuellement transmise à travers l'organe. Voir le texte pour les détails.....	15
<b>Figure 9</b> : courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière de feuille (en haut, cercles pleins), de tige l'année (en bas, triangles pleins) et de tige d'un an (en bas, triangles ouverts) de peuplier. PPFD : densité de flux de photon dans le PAR. D'après Aschan et al. (2001). ....	17
<b>Figure 10</b> : courbes de réponses de R <sub>d</sub> et A <sub>g</sub> , (mesurée à PAR saturant) à la température effectuées sur des tiges de 1-2 ans de hêtre. D'après Wittmann & Pfanz (2007) .....	18
<b>Figure 11</b> : courbes de réponse du flux linéaire d'électrons au travers du PSII (ETR) en fonction de l'intensité lumineuse (PPFD) effectuées sur des feuilles et tiges de <i>Prunus cerasus</i> . D'après Manetas (2004). ....	19
<b>Figure 12</b> : chambre "conifer chamber" LI-6400-05 utilisée avec l'analyseur LI-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE) pour les mesures d'échanges gazeux des tiges. Ici, une tige de l'année d'épicéa ( <i>Picea abies</i> ) dépourvue de ses aiguilles.....	26

<b>Figure 13</b> : tiges de l'année des neuf espèces d'arbres étudiées dans l'expérimentation de comparaison interspécifique de la photosynthèse des tiges. Pour la photographie, les tiges ont été dépourvues de leurs feuilles.....	27
<b>Figure 14</b> : exemples de coupes de tiges de l'année prélevées en hiver sur des espèces d'arbres du campus d'Orsay et observées en microscopie à épifluorescence. La chlorophylle fluoresce naturellement dans le rouge ce qui permet de la localiser aisément. A : <i>Fraxinus excelsior</i> , B : <i>Alnus glutinosa</i> , C : <i>Pinus sylvestris</i> , D : <i>Picea abies</i> , E : <i>Magnolia macrophylla</i> , F : <i>Ginkgo biloba</i> . Barres d'échelles = 100 $\mu\text{m}$ (A, D) et 200 $\mu\text{m}$ (B, C, E, F). .....	28
<b>Figure 15</b> : réactions de carboxylation et d'oxygénation catalysées par la Rubisco.....	40
<b>Figure 16</b> : réaction catalysée par la PEPC. ....	40
<b>Figure 17</b> : hêtre adulte de 28 ans photosgraphié peu de temps après le débourrement (25 avril 2003). .....	41
<b>Figure 18</b> : relation entre les activités PEPC et Rubisco mesurées sur les tiges de l'année (triangles bruns) et les feuilles de hêtre (triangles verts) au cours de la saison de végétation, et mesurées en juin sur les tiges de l'année des différentes espèces étudiées (triangles inversés noirs). Les valeurs correspondent aux moyennes sur trois arbres. Les lignes en pointillées sont des indications des rapports PEPC/Rubisco (0.1, 1 et 10). .....	42
<b>Figure 19</b> : (a) l'hypothèse d'Hibberd & Quick suppose qu'une PEPC fixe le $\text{CO}_2$ au niveau des racines, en formant du malate, et que ce malate est ensuite transporté par le flux xylémien au niveau des feuilles afin d'y être décarboxylé (via la NADP-ME, NAD-ME et PEPCK). A partir du pyruvate, le PEP est régénéré par des la PPDK au niveau des tiges puis renvoyé dans la racine via le phloème. (b) Analogies probables entre une feuille d'une plante à métabolisme $\text{C}_4$ et la tige de tabac, plante à métabolisme $\text{C}_3$ . D'après Hibberd & Quick (2002). 54	54
<b>Figure 20</b> : jeune tige de l'année de hêtre prélevée peu de temps après le débourrement (fin avril). Barre d'échelle = 1 cm. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 21</b> : (a) représentation schématique d'une section de tige de bourgeon de hêtre avec un faisceau criblovasculaire défini par le phloème et le xylème et (b) électronographies de cellules de l'épiderme de cette tige. Barres d'échelles : (1) 2 $\mu\text{m}$ , (2) 500 nm, (3) 10 $\mu\text{m}$ et (4) 500 nm.....	55
<b>Figure 22</b> : exemples de cinétiques de l'activité PEPC permettant le calcul de son pH optimum (a), du $K_m$ PEP (b) et de l'IC50 malate (c). .....	56
<b>Figure 23</b> : fonction anaplérotique de la PEPC chez les plantes qui consiste à soutenir la production d'intermédiaire du cycle de Krebs quand l'assimilation d'azote nécessite des squelettes carbonés pour former les acides aminés par l'intermédiaire notamment de la glutamate synthase (GS) et de la GOGAT (glutamine - $\alpha$ Ketoglutarate aminotransferase). .....	68
<b>Figure 24</b> : schéma synthétique d'une cellule de tige indiquant les différentes voies possibles d'intégration du $\text{CO}_2$ dans le métabolisme carboné (en bleu) et impliquant les enzymes PEPC, Rubisco et NADP-ME. Notre hypothèse est que la PEPC fixe prioritairement le $\text{CO}_2$ . Ce dernier est ensuite libéré par la NADP-ME dans l'environnement proche de la Rubisco. Les flèches bordeaux indiquent la voie anaplérotique.....	88
<b>Figure 25</b> : signature isotopique du $\text{CO}_2$ dégagé par les tiges de peuplier ( <i>Populus tremuloides</i> ) et de pin ( <i>Pinus monticola</i> ) en fonction de la lumière incidente (PPFD). D'après Cernusak et al. (2001). .....	91
<b>Figure 26</b> : tiges de l'année de hêtre positionnées dans la "conifer-chamber" du LiCor 6400 en vue du marquage au $^{13}\text{C}_2$ . .....	91
<b>Figure 27</b> : signatures isotopiques des différentes sources d'air prélevées pendant et après le marquage au $^{13}\text{C}_2$ à deux dates différentes (16-avr-07, cercles et 20-avr-07, triangles). Le marquage a commencé à 11:00 et s'est terminé à 13:00. Le $\delta^{13}\text{C}$ a été mesuré sur des prélèvements d'air de la pièce pendant le marquage (symboles bleus), toutes les demi-heures sur le $\text{CO}_2$ respiré par les tiges de la chambre après le marquage (symboles oranges), sur le $\text{CO}_2$ respiré par les feuilles (cercle ouvert vert) et les tiges (cercle ouvert marron) situées à l'extérieur de la chambre vers la partie apicale et, enfin, sur des feuilles (cercle plein vert) et des tiges (cercle plein marron) témoins, n'ayant pas subi de marquage. ....	92

## Tableaux :

<b>Tableau 1</b> : caractéristiques rencontrées pour des plantes à différents types de photosynthèse de tige. D'après Nilsen (1989).....	3
--	---

**Tableau 2** : concentrations en CO<sub>2</sub> (dans la phase gazeuse, % ou dans la phase liquide, mmol l<sup>-1</sup>) mesurées dans les tiges de diverses espèces d'arbres. Les mesures ont été réalisées in situ directement sur la tige en utilisant une microélectrode ou un détecteur à infrarouges non dispersifs (NDIR), ou sur des échantillons de gaz extraits de la tige en utilisant l'absorption chimique (CA), la spectrométrie de masse (GC-MS) ou encore un analyseur de gaz à infrarouge (IRGA). \* = concentrations en CO<sub>2</sub> mesurées dans la phase liquide..... 9

**Tableau 3** : transmittances (en pourcentage de la lumière incidente) mesurées à travers le suber de tiges de différents âges et de différentes espèces d'arbres. Sauf indiqué entre parenthèses, la gamme de longueur d'onde utilisée pour la lumière incidente était dans le visible..... 16

**Tableau 4** : variabilité interspécifique du pourcentage de refixation maximal (mesuré à éclairage saturant) pour des tiges d'âges variables. .... 20

**Tableau 5** : gammes de variations sur la saison de végétation (saison) et valeurs d'été (juin - juillet) de plusieurs traits écophysologiques mesurés sur les feuilles et tiges de l'année de hêtre au cours de cette étude..... 87

## Annexes :

**Annexe 1** : Le cycle de Calvin-Benson-Bassham ..... 107

**Annexe 2** : La glycolyse, le cycle de Krebs et la voie anaérobie..... 108

**Annexe 3** : Schéma simplifié du métabolisme C<sub>4</sub> indiquant la séparation spatiale des processus enzymatiques impliqués..... 109

**Annexe 4** : Préparation d'échantillons de tiges de *Fagus sylvatica* L. en vue de la réalisation de coupes ultrafines observées sous MET..... 110

**Annexe 5** : Protocole de Western Blot pour la détection de la PEPC des tiges de *Fagus sylvatica* L..... 113



# ***I) INTRODUCTION***

---



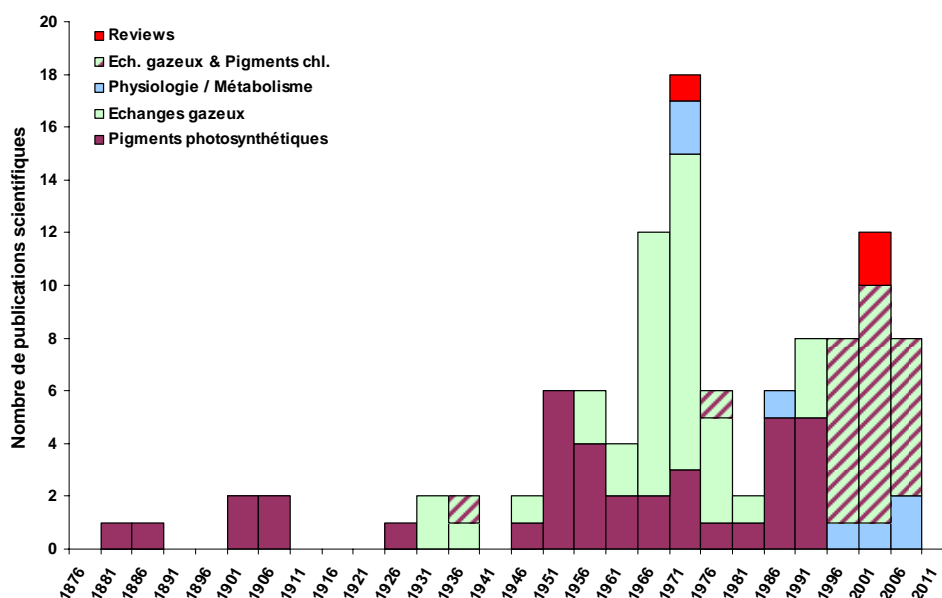


## A. Contexte général

Le compartiment ligneux aérien des arbres des forêts tempérées représente 80 à 90 % de la biomasse aérienne totale dont 75 à 80 % sont attribués au tronc (Mahli *et al.*, 1999). Ce compartiment est connu pour avoir au moins trois fonctions majeures : soutien, transport et stockage (Givnish, 1995). De part sa position dans l'individu, le compartiment ligneux aérien est au carrefour des échanges de matière entre le sol, les feuilles et l'atmosphère. Que ce soit à l'échelle de l'écosystème ou de l'individu, l'intégralité du compartiment ligneux aérien doit par conséquent être prise en compte dans les bilans carbonés qui tiennent compte des entrées et sorties de carbone. Les sorties de carbone sont représentées par la respiration des différents compartiments de l'écosystème. A cette échelle, la respiration du compartiment ligneux aérien est peu documentée mais quelques études montrent qu'elle représente 11 à 25 % de la GPP<sup>1</sup> (Mahli *et al.*, 1999; Granier *et al.*, 2000; Damesin *et al.*, 2002) qui correspond aux entrées de carbone dans l'écosystème par la photosynthèse foliaire.

La photosynthèse foliaire est un processus bien connu. Les réponses de la photosynthèse foliaire aux variations de l'environnement sont bien caractérisées et les modèles de bilan de carbone des écosystèmes les intègrent comme processus d'entrée de carbone dans le système étudié (Farquhar *et al.*, 1980). Concernant le compartiment ligneux aérien, il est exclusivement considéré en tant que puits de carbone dans les modèles et il n'en existe pas qui tiennent compte de la capacité des tiges à assimiler du carbone (Pfanzen *et al.*, 2000). Pourtant, du côté des plantes monocotylédones, une étude récente montre qu'il est nécessaire de prendre en compte la photosynthèse des organes non foliaires à hauteur de 63 % de la photosynthèse foliaire pour boucler le bilan de carbone à l'échelle de la canopée (Hoyaux *et al.*, 2008). En effet, ces espèces, et plus généralement les plantes monocotylédones, possèdent des organes aériens verts "non foliaires" (tige, fleurs, fruits) qui participent de façon non négligeable au bilan carboné et notamment aux dépenses énergétiques lors de la reproduction (Bazzaz & Carlson, 1979; Bazzaz *et al.*, 1979; Reeke & Bazzaz, 1987; Marcelis & Hofman-Eijer, 1995).

Chez les arbres, la présence de tiges ligneuses et d'une écorce composée de tissus morts (suber) peut suggérer que la photosynthèse des tiges est inexistante. Pourtant, de nombreuses études ont montré que la tige ligneuse est capable de photosynthétiser. La **figure 1** illustre l'évolution du nombre d'articles publiés sur la photosynthèse des tiges ligneuses depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle.



**Figure 1 :** évolution du nombre d'articles publiés sur la photosynthèse des tiges des arbres depuis 1875, représentée par classes de cinq années. Chaque couleur correspond à un thème de recherche donné.

<sup>1</sup> GPP : Gross Primary Production

Les premiers travaux ayant mentionné une assimilation de carbone par la tige datent des années 1880-1900 (Moeller, 1882; Scott, 1907). Jusqu'en 1930, les publications scientifiques n'ont concerné que les pigments chlorophylliens. La première expérience directe mettant en évidence une assimilation de carbone date de 1936, et repose sur l'utilisation des techniques d'échanges gazeux (Larsen, 1936). Depuis, de nombreuses études se sont penchées sur la problématique de la photosynthèse des tiges. La majorité des articles publiés jusqu'en 1971 n'ont toujours concerné que les pigments chlorophylliens et/ou les échanges gazeux. Après un léger creux dans les années 80, le sujet revient à la mode avec l'utilisation d'outils et de méthodes scientifiques modernes. Enfin, notons la publication de trois articles synthétiques (reviews) : Schaedle (1975), Pfanz *et al.* (2002) et Aschan & Pfanz (2003).

Erik T. Nilsen a travaillé entre 1989 et 1996 sur la photosynthèse des tiges d'herbacées et d'arbustes dont, notamment, de Soja (*Glycine max*), de genêt d'Espagne (*Spartium junceum*) et genêt à balais (*Cytisus scoparius*), et de quelques euphorbiacées à photosynthèse CAM (crassulacean acid metabolism) (Nilsen, 1989; 1990; 1992; 1992; 1993; 1994; 1994; 1996; 1997). A partir de ses résultats et de recherches antérieures, il a classé en trois catégories les types de photosynthèse de tige en fonction des caractéristiques photosynthétiques observées (**tableau 1**). Ces catégories correspondent :

- aux plantes pour lesquelles la tige toute entière est capable de photosynthétiser,
- aux plantes pour lesquelles il n'y a seulement que l'écorce de la tige qui photosynthétise,
- aux plantes CAM (plantes désertiques).

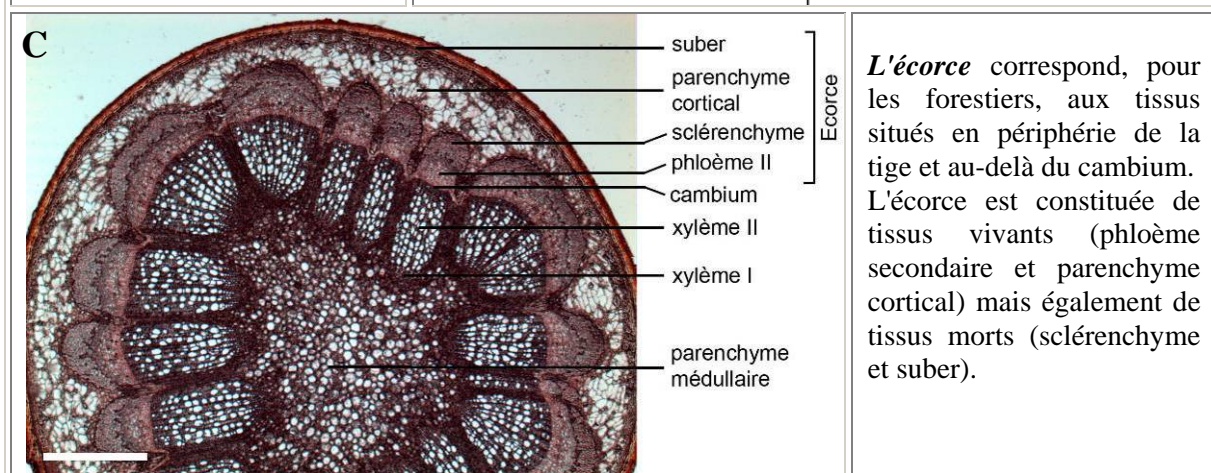
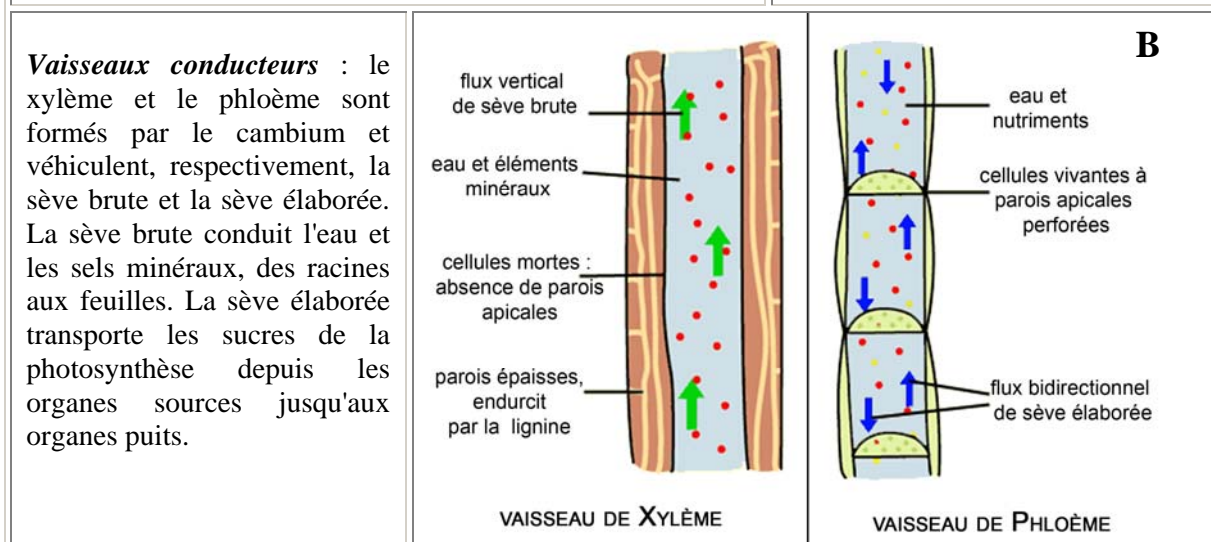
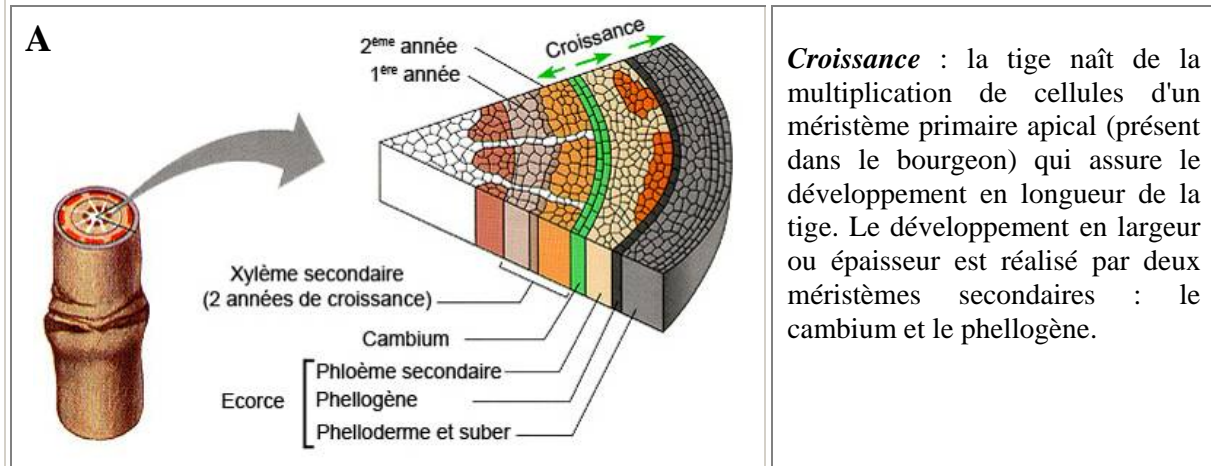
Caractéristiques ...		Type de photosynthèse		
		(1) Photosynthèse des tiges entières	(2) Photosynthèse corticulaire	(3) Photosynthèse des tiges de plantes CAM
...de la plante entière	Métabolisme	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	CAM
	Abondance de feuilles	Non – Ephémère	Présent	Vestigial
...des tiges	Présence de stomates	Oui	Non	Oui
	Couche palissadique	Multiple	Absente	Présente
	Photosynthèse nette	oui	non	oui

**Tableau 1** : caractéristiques rencontrées pour des plantes à différents types de photosynthèse de tige. D'après Nilsen (1989).

D'après cet auteur, les tiges des arbres, plantes à métabolisme C<sub>3</sub>, assimileraient le carbone par la partie périphérique de la tige. Dans le langage courant, l'écorce est assimilée aux tissus externes généralement constitués de cellules mortes qu'on appelle en fait "rhytidome". En foresterie, l'écorce représente l'ensemble des tissus produits vers l'extérieur par le cambium. Dans ce cas, chez l'arbre, elle sera notamment composée du phloème, du parenchyme cortical et du suber (= liège). Au cours de la croissance en épaisseur de la tige, le parenchyme cortical est compacté progressivement au profit du suber qui se développe en épaisseur (**figure 2A**). Le suber prend alors la place de l'épiderme qui aura totalement disparu. Ainsi, de nombreuses études ayant fait suite au constat de Nilsen rappellent très souvent que la tige des arbres présente une photosynthèse de type corticulaire ou "bark photosynthesis".

Dans les paragraphes qui suivent et qui introduisent le travail de thèse, il sera tout d'abord question des fonctions majeures de la tige ligneuse dans l'arbre. La tige est avant tout un organe de transport et de gestion du carbone, depuis son entrée dans l'arbre par la photosynthèse foliaire jusqu'à sa mise en réserve. Il est important de présenter ces fonctions afin de pouvoir mieux comprendre et discuter la fonction de photosynthèse des tiges qui sera présentée ensuite, tant au niveau des aspects physicochimiques que des aspects écophysiologiques.

**Définition** : la tige est, chez les plantes à fleurs, l'axe qui prolonge la racine et porte les bourgeons, les feuilles et les fleurs. Chez l'arbre, la tige principale est le tronc qui se ramifie en branches puis en brindilles. Par extension, la tige de l'arbre peut correspondre à chacun de ces organes qui composent le compartiment ligneux aérien.



**Figure 2** : schémas de (A) la structure et de l'anatomie de tige, (B) des vaisseaux de xylème et de phloème, et (C) coupe transversale de tige de l'année de hêtre (*Fagus sylvatica* L.), observée sous microscope optique. Barre = 700 µm.

Image A : d'après [http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/105F00\\_8.html](http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/105F00_8.html),

Image B : d'après <http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/biology/greenplantsasorganisms/1watertransportrev3.shtml>

Image C : photographie réalisée au cours de cette thèse

## B. La tige dans la gestion du carbone de l'arbre

### 1) Transport et stockage du carbone assimilé

Les tiges se situent à l'interface entre les feuilles et les racines. C'est le phloème (**figure 2**) qui assure le transport des assimilats carbonés depuis les feuilles jusqu'aux organes puits. Les cellules criblées du phloème sont des cellules vivantes, au cytosol vidé de leurs organites et maintenues en vie grâce à leurs cellules compagnes.

#### a) Transport des photosynthétats foliaires

Les photosynthétats, produits issus de la photosynthèse, sont des glucides (ou sucres simples) représentés notamment par le glucose, le fructose et le saccharose. Du fait des gradients de concentration entre les cellules productrices et le phloème, ces sucres, principalement le saccharose, sont "chargés" dans le phloème au niveau des feuilles par les voies apoplasmiques et/ou symplasmiques (Van Bel, 1993; Turgeon & Medville, 2004) via des transporteurs transmembranaires (Lemoine, 2000).

Peu de données existent sur la composition de la sève élaborée d'arbres adultes en raison de la difficulté à l'extraire. En effet, la technique consistant à utiliser des pucerons et récolter leur miellat (Yoneyama *et al.*, 1997) nécessite des conditions de laboratoire tandis qu'une autre pour laquelle la sève phloémienne est récoltée par incision de l'écorce (Pate *et al.*, 1998) peut uniquement être réalisée sur des arbres pour lesquels l'écorce est lisse. Malgré tout, il a été montré que les sucres représentent environ 20 % (m/v) de la sève élaborée (Pate *et al.*, 1998), ce qui est comparable à ce qui a été mesuré chez les graminées (17-25 % chez le riz, Fukumorita & Chino, 1982). A lui seul, le saccharose représente 95 % des sucres totaux de la sève (Gessler *et al.*, 2004).

Le transport de ces sucres se fait principalement pendant la saison de croissance via le phloème. D'après la théorie de Münch sur le flux de masse des assimilats (Münch, 1930), la translocation des sucres et leur vitesse de diffusion dans le phloème est complètement régulée par le chargement aux organes sources et le déchargement dans les organes puits, qui créent un gradient de concentration permanent (Gifford & Evans, 1981; Bancal & Soltani, 2002). Comme indiqué dans la **figure 2.B**, le flux de sève élaborée, et donc potentiellement celui des sucres, peut se faire dans les deux sens alimentant des organes puits situés aussi bien au-dessus qu'en dessous de l'organe source.

#### b) Stockage et gestion des réserves carbonées

Les hypothèses d'allocation supposent que les plantes ont des réserves limitées d'une ressource (carbone, azote) qu'elles doivent répartir selon plusieurs fonctions en concurrence, généralement définies comme la croissance, l'entretien, l'accumulation de réserves et la reproduction (Bazzaz, 1997). Les stratégies d'allocation du carbone dans telle ou telle fonction seront dépendantes du cycle de vie de la plante, i.e. plante annuelle ou plante pérenne (Chapin *et al.*, 1990). Pour les plantes pérennes telles que les arbres, les organes ligneux jouent un rôle très important dans le stockage et la gestion des réserves.

##### b.1) Nature et localisation

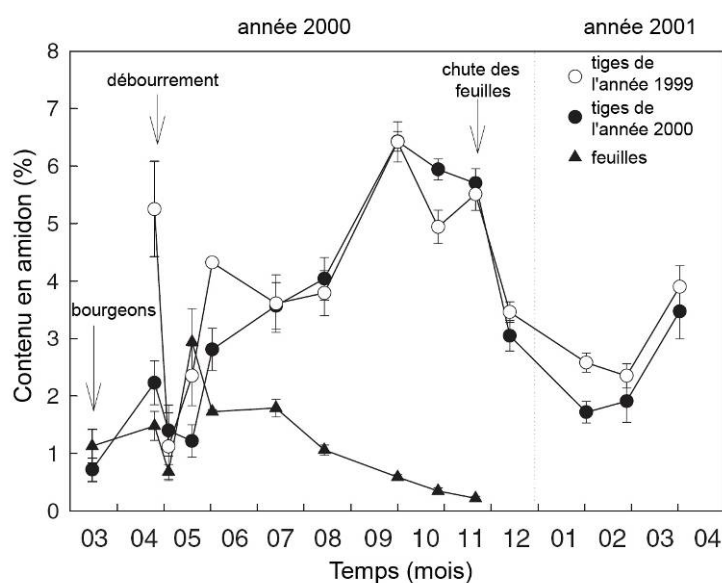
Dans les tiges et les racines, les réserves carbonées (ou sucres de réserves) sont localisées dans les cellules vivantes parenchymateuses du xylème et du phloème. Ces réserves sont de types glucidiques et se décomposent en trois groupes : monosaccharides (glucose, fructose), disaccharides

(saccharose) et polysaccharides (amidon). Ces réserves sont des sucres non structuraux, c'est-à-dire qu'ils n'interviennent pas dans la structure des cellules. Ils sont donc mobilisables à tout moment.

L'amidon est le composé de réserve le plus abondant. En hiver, il représenterait 35 à 70 % des sucres totaux de l'aubier de jeunes tiges (Hoch *et al.*, 2003) et le saccharose représenterait 75 % des sucres simples<sup>2</sup> (Kramer & Kozlowski, 1979). En fonction de l'espèce, de l'âge et de la période de prélèvement, les concentrations en sucres et en amidon varieront de 4.4 à 20 % (masse/masse MS) dans les tiges et les branches et entre 4.5 et 28.5 % (masse/masse MS) dans les racines (Barbaroux, 2002). A l'échelle d'un arbre adulte tout entier, les sucres de réserve sont majoritairement présents dans le compartiment ligneux aérien qui stocke 56 % (masse/masse C) des réserves carbonées chez le chêne (44 % dans le compartiment ligneux souterrain) et 65 % (masse/masse C) chez le hêtre, que ce soit en été ou en hiver (Barbaroux *et al.*, 2003).

## b.2) Dynamique saisonnière et interannuelle

Les variations saisonnières des réserves carbonées de la tige sont généralement calées sur les différents événements qui composent la saison de végétation de l'arbre. Ainsi, pour les réserves glucidiques, deux phases de diminution des réserves sont observées : au cours de l'hiver (à partir de la chute des feuilles) et au printemps, juste après le débourrement. En hiver, en fonction de la température, l'amidon est plus ou moins hydrolysé en sucres simples afin de fournir de l'énergie au maintien des organes (Sauter, 1988). Pendant la phase de croissance foliaire, le stock des glucides se reconstruit progressivement pour atteindre une valeur maximale en automne, peu avant la chute des feuilles (Kramer & Kozlowski, 1979). Par exemple, on observe cette dynamique saisonnière sur le contenu en amidon des jeunes tiges de hêtre (**figure 3**).



**Figure 3** : variation saisonnière du contenu en amidon des feuilles, des tiges de l'année (2000) et tiges d'un an (1999) de hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Les points représentent les moyennes ( $\pm 1$  erreur standard). D'après Damesin & Lelarge (2003).

Les dynamiques saisonnières des autres glucides tels que le fructose, le glucose et le saccharose sont bien évidemment liées à celle de l'amidon puisqu'ils sont les produits de son hydrolyse. Que ce soit chez la tige ou la feuille, une augmentation des sucres simples est ainsi observée peu après le débourrement, faisant suite à l'hydrolyse de l'amidon des réserves (Damesin & Lelarge, 2003, Hoch, 2003 #335). Pendant la période de croissance, les concentrations de glucose et de fructose diminuent progressivement alors que celle du saccharose semble varier en fonction de l'âge du tissu et de l'espèce. De manière générale, les dynamiques saisonnières des réserves carbonées sont comparables d'une espèce ligneuse à l'autre (Ashworth *et al.*, 1993; Witt & Sauter, 1994; Barbaroux & Breda, 2002).

<sup>2</sup> Les sucres simples correspondent aux glucides simples, i.e. monosaccharides et disaccharides.

Il existe très peu de données sur les variations interannuelles des réserves chez les arbres. Il apparaît toutefois que la dynamique saisonnière des réserves glucidiques reste inchangée d'une année sur l'autre mais que les minima et les maxima varient entre années (Sauter & Wellenkamp, 1998). Le remplissage des réserves carbonées est également associé à la production de protéines de réserves (Staswick, 1994). Pour les espèces d'arbres décidus, une grande partie de l'azote foliaire est remobilisée dans les tiges de l'arbre, et notamment l'écorce, peu de temps avant la chute des feuilles (Stepien *et al.*, 1994). Cet azote est en partie accumulé dans des protéines de réserves (les VSPs, vegetative storage proteins) à l'automne. Peu avant le débourrement, la protéolyse des VSPs apportera l'azote disponible pour les organes en croissance.

## 2) La respiration des organes ligneux aériens

La respiration du compartiment ligneux aérien représente 17 à 67 % de la respiration annuelle de l'écosystème forestier. Les valeurs mesurées de la respiration des tiges dépendent de l'âge de l'organe et de l'espèce considérée mais également de la période de mesure.

### a) Variabilité de la respiration

#### a.1) Variabilité temporelle

La variabilité temporelle de la respiration des tiges est liée notamment au fonctionnement de l'arbre (période croissance versus période de dormance) et à la température (Ryan, 1990).

La respiration totale ( $R_t$ ) est généralement séparée en deux composantes ayant des voies métaboliques identiques : la respiration de croissance ( $R_g$ ) et la respiration d'entretien ( $R_m$ ) (Sprugel, 1989; Ryan, 1990). La respiration de croissance fournit l'énergie à la biosynthèse de nouveaux tissus alors que la respiration d'entretien fournit l'énergie au maintien des tissus en place. Plus le volume des tissus vivants, répartis essentiellement dans le parenchyme cortical (écorce) et les rayons ligneux, est grand, plus la respiration augmente (Ryan, 1990; Ceschia, 2001). Généralement,  $R_m$  est positivement corrélée au contenu en azote car le turnover des protéines contribue pour une grande part à la respiration d'entretien (Ryan, 1991; Ryan, 1995).

En forêt tempérée, la respiration des tiges présente dans la plupart des cas une dynamique saisonnière en "cloche" avec un maximum en juin, i.e. au maximum de la croissance (Ryan, 1990; Sprugel, 1990; Ceschia, 2001; Damesin *et al.*, 2002). A l'échelle de la saison, la respiration d'entretien ( $R_m$ ) des tiges est estimée au cours de l'hiver car c'est la période où il n'y a pas de croissance. En supposant que  $R_m$  est constant au cours de la saison,  $R_g$  peut donc être facilement calculée pendant la saison de croissance en soustrayant  $R_m$  à  $R_t$ . A l'échelle de l'année,  $R_m$  représente 55 % de  $R_t$  pour une tige de l'année de hêtre (Damesin, 2003). L'hypothèse forte d'une absence de variation de  $R_m$  au cours de la saison est toutefois discutable car la dynamique de réponse de la respiration à la température et les valeurs de base, e.g.  $R_{15}^3$ , sont variables d'une saison à l'autre.

La première personne ayant mis en évidence une relation entre la respiration et la température était le physicien et chimiste suédois, Arrhenius (1889). En effet, il fût le premier à utiliser une équation de type exponentielle (**équation 1**) avec une constante  $Q_{10}$  proche de 2. La constante  $Q_{10}$  est le facteur par lequel la respiration est multipliée lorsque la température augmente de 10°C.

$$R_T = R_{T_{ref}} \times Q_{10}^{\frac{T-T_{ref}}{10}}$$

T : température de la tige, °C  
 $T_{ref}$  : température de référence, °C  
 $R_{T_{ref}}$  : respiration de la tige à  $T_{ref}$  (souvent 15°C)  
 $Q_{10}$  : facteur par lequel la respiration est multipliée pour une augmentation de T de 10°C

**Equation 1** : expression de la respiration en fonction de la température.

<sup>3</sup>  $R_{15}$  : flux respiratoire estimé à 15 °C



De très nombreuses études ont utilisé cette fonction pour estimer les variations de la respiration des organes au cours des saisons. A titre d'exemple chez le hêtre, tout au long de la saison, le  $Q_{10}$  varie entre 1.5 et 2.1 pour le tronc, entre 1.8 et 4 pour les branches et entre 1.3 et 2.0 pour les tiges de l'année (Damesin *et al.*, 2002; Damesin, 2003). En moyenne sur le hêtre, il a été montré que le  $Q_{10}$  est dépendant de l'âge et que plus le diamètre de la tige augmente, plus le  $Q_{10}$  diminue (Damesin *et al.*, 2002).

### **a.2) Variabilité spatiale**

Ici, la variabilité de la respiration des tiges est considérée à l'échelle de l'individu mais également à l'échelle des tissus qui composent la tige.

Au sein même de l'arbre, la respiration de la tige varie. Plus l'âge des tiges augmente et plus la proportion en masse de cellules vivantes diminue. Chez le hêtre et l'épicéa, la variabilité intra-arbre est plus importante lorsque la respiration est exprimée par unité de volume que lorsqu'elle est exprimée par unité de surface (Ceschia, 2001).

Les données concernant la variabilité spatiale de la respiration au sein même de la tige sont peu nombreuses. Il n'existe pas de mesures réalisées *in situ* mais quelques études ont estimées la respiration des différents tissus de la tige *in vitro*. Le potentiel respiratoire de l'écorce interne est ainsi 2 à 3.5 fois plus fort que celui de l'aubier pour des tiges de diamètres variables de *Dacrydium cupressinum* (Bowman *et al.*, 2005) et pour les troncs de *Pseudotsuga menziesii* (Pruyn *et al.*, 2002). Cette observation est liée la présence majoritaire de cellules vivantes (Stockfors & Linder, 1998; Ceschia, 2001) et d'azote (Ceschia, 2001; Bowman *et al.*, 2005) dans l'écorce interne et les rayons ligneux de l'aubier.

## **b) Respiration = efflux de CO<sub>2</sub> ?**

Les techniques permettant la mesure de la respiration d'un organe ligneux aérien ou souterrain sont basées sur l'utilisation d'une chambre qui entoure l'organe (cas des petites tiges) ou qui est éventuellement plaquée contre l'organe (cas parfois du gros tronc). La mesure de l'efflux de CO<sub>2</sub> à un instant donné est donc supposée être identique à celle de la respiration de l'organe. Bien qu'une partie du CO<sub>2</sub> est effectivement respirée et qu'elle est rejetée vers l'atmosphère, il apparaît toutefois qu'à l'échelle de la journée, 15 à 55 % du CO<sub>2</sub> respiré peut rester dans la tige (Teskey *et al.*, 2008).

### **b.1) Concentrations de CO<sub>2</sub> dans la tige.**

Le compartiment ligneux aérien de l'arbre peut contenir une quantité considérable de gaz. Gartner *et al.* (2004) ont montré que la fraction gazeuse représentait 18 à 26 % du volume de la sève brute et 26 à 50 % du volume du bois de cœur d'espèces tempérées.

A cause de la forte imperméabilité de l'écorce, la diffusion des gaz à travers elle est fortement diminuée et, en l'occurrence, le CO<sub>2</sub> respiré se retrouve en grande partie piégé dans la tige. Par conséquent, sa concentration augmente au sein de la tige et peut atteindre jusqu'à 26.3 % de la phase gazeuse, soit une fraction molaire de 263 000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (**tableau 2**).

Ces fortes concentrations de CO<sub>2</sub> posent bien évidemment des questions, en particulier sur sa localisation dans la tige, sur les proportions des différentes formes dissoutes (CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>3-</sup>) et de son effet sur le pH et sur le métabolisme cellulaire.

Généralement, le gaz est situé dans les vaisseaux non fonctionnels, ayant, en partie, subi l'embolie hivernale. Des poches de gaz sont en effet visibles dans des vaisseaux de xylème observés par microscopie optique (Hargrave *et al.*, 1994) ou par cryomicroscopie à balayage (Tyree *et al.*, 1999; Utsumi *et al.*, 2003). Le gaz est également localisé dans les espaces intercellulaires et les pores des parois cellulaires (méats) qui ne représentent cependant pas plus de 1 % du volume total de la tige (Gartner *et al.*, 2004).



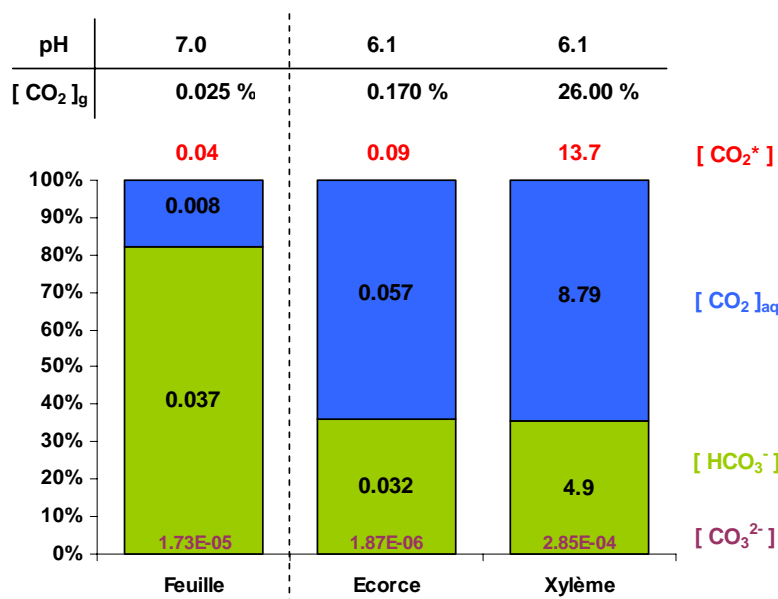
<b>Espèce</b>	<b>Concentrations en CO<sub>2</sub> dans la tige (% ou mmol l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Méthode employée</b>	<b>Référence</b>
<i>Acer platanoides</i>	2.0 – 4.0	GC-MS	Eklund (1993)
<i>Betula pendula</i>	3.0	IRGA	Levy <i>et al.</i> (1999)
<i>Fagus grandifolia</i>	2.0 – 4.5*	Microélectrode	McGuire & Teskey (2004)
<i>Fagus sylvatica</i>	2.4 – 2.5	Microélectrode	Saveyn <i>et al.</i> (2006)
<i>Juglans major</i>	5.0 – 22.0	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Liquidambar styraciflua</i>	1.5 – 2.8*	Microélectrode	McGuire & Teskey (2004)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	1.9 – 15.9	Microélectrode	Teskey & McGuire (2002)
<i>Musanga cecropioides</i>	8.5	IRGA	Levy <i>et al.</i> (1999)
<i>Picea abies</i>	2.0 – 10.0	GC-MS	Eklund (1993)
<i>Pinus radiata</i>	1.2 – 13.5	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Pinus strobus</i>	1.1 – 12.3	CA	Chase (1934)
	0.1 – 0.2	GC	Cernusak & Marshall (2000)
<i>Pinus taeda</i>	1.0 – 8.0	Microélectrode	Maier (2006)
<i>Platanus occidentalis</i>	1.7 – 3.5*	Microélectrode	McGuire & Teskey (2004)
	6.9 – 12.1	NDIR	Teskey & McGuire (2007)
<i>Populus deltoides</i>	0.3 – 25.2	CA	Chase (1934)
	9.5 – 12.7	Microélectrode	Steppe <i>et al.</i> (2007)
	3.9 – 17.6	NDIR	Saveyn <i>et al.</i> (2008)
<i>Populus macdouglie</i>	1.4 – 18.2	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Populus tremuloides</i>	5.4	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Quercus agrifolia</i>	1.2 – 26.3	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Quercus alba</i>	1.6 – 15.1	Microélectrode	Teskey & McGuire (2002)
<i>Quercus borealis</i>	0.4 – 5.5	CA	Chase (1934)
<i>Quercus macrocarpa</i>	0.4 – 3.0	CA	Chase (1934)
<i>Quercus robur</i>	3.0 – 9.0	GC-MS	Eklund (1993)
	0.3 – 3.4*	Microélectrode	Saveyn <i>et al.</i> (2007)
<i>Quercus rubra</i>	13.5 – 16.5	CA	Jensen (1967)
<i>Salix lasiolepis</i>	6.2 – 13.3	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Sequoia sempervirens</i>	0.8 – 10.4	CA	MacDougal & Working (1933)
<i>Ulmus americana</i>	0.8 – 16.3	CA	Chase (1934)

**Tableau 2** : concentrations en CO<sub>2</sub> (dans la phase gazeuse, % ou dans la phase liquide, mmol l<sup>-1</sup>) mesurées dans les tiges de diverses espèces d'arbres. Les mesures ont été réalisées in situ directement sur la tige en utilisant une microélectrode ou un détecteur à infrarouges non dispersifs (NDIR), ou sur des échantillons de gaz extraits de la tige en utilisant l'absorption chimique (CA), la spectrométrie de masse (GC-MS) ou encore un analyseur de gaz à infrarouge (IRGA). \* = concentrations en CO<sub>2</sub> mesurées dans la phase liquide.

A l'interface gaz-liquide, le CO<sub>2</sub> se dissout plus ou moins dans la phase liquide en fonction de sa concentration, du pH et de la température. Les valeurs de pH obtenues sur le liquide extrait de tiges d'arbres sont comprises entre 4.5 et 7.4 (moyenne = 6.1 ± 0.7, voir Teskey *et al.* (2008) pour revue). A pH = 6.1 et à une température de 25°C, les formes CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> représentent respectivement 64.2, 35.8 et 0.002 % de la concentration totale de CO<sub>2</sub> dissout. En prenant en compte les concentrations maximales observées dans le xylème (26 %) et dans l'écorce (0.17 %), on peut calculer les concentrations des différentes formes dissoutes de carbone dans la phase liquide (à pH 6.1 et à 25°C, **figure 4**). On se rend alors compte que dans l'écorce, là où se trouve le chlorenchyme, la concentration en CO<sub>2</sub> dissout est deux fois plus importante que dans la feuille (respectivement 0.09 et 0.04 mmol l<sup>-1</sup>) mais reste cependant bien loin des concentrations mesurées dans le xylème.

Pour la plupart des espèces, l'assise cambiale (située entre le bois et l'écorce) présente une forte résistance à la diffusion latérale des gaz (Kramer & Kozlowski, 1979) ce qui peut expliquer les grandes variations de concentrations en CO<sub>2</sub> mesurées entre le xylème et l'écorce. Alors que la

concentration en CO<sub>2</sub> peut atteindre jusqu'à 26.3 % dans le xylème (**tableau 2**), celle mesurée dans l'écorce est située entre 0.06 et 0.17 % (Cernusak & Marshall, 2000; Wittmann *et al.*, 2006).



**Figure 4** : concentrations en CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]<sub>g</sub>, en %) dans la phase gazeuse, et concentrations (en mmol l<sup>-1</sup>) et proportions (en %) des différentes formes dissoutes de carbone ([CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub>, [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) dans la feuille, l'écorce et le bois, calculées aux pH moyens représentatifs du tissu (ou de l'organe considéré) et à 25°C. [CO<sub>2</sub>\*] représente la concentration en CO<sub>2</sub> dissout total ([CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> + [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

## b.2) Flux de CO<sub>2</sub> dans et à travers la tige

### • Efflux de CO<sub>2</sub>

L'efflux de CO<sub>2</sub> est fortement dépendant de la résistance des tissus externes à la diffusion du CO<sub>2</sub> (équation 2).

$$E_A = \frac{\Delta[CO_2]}{R}$$

$E_A$  : efflux de CO<sub>2</sub>, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 $\Delta[CO_2]$  : différence de concentration en CO<sub>2</sub> entre l'intérieure de la tige et l'atmosphère  
 $R$  : ensemble des résistances à la diffusion du CO<sub>2</sub>

**Equation 2** : relation entre l'efflux de CO<sub>2</sub> de la tige et la diffusion du CO<sub>2</sub> à travers l'écorce

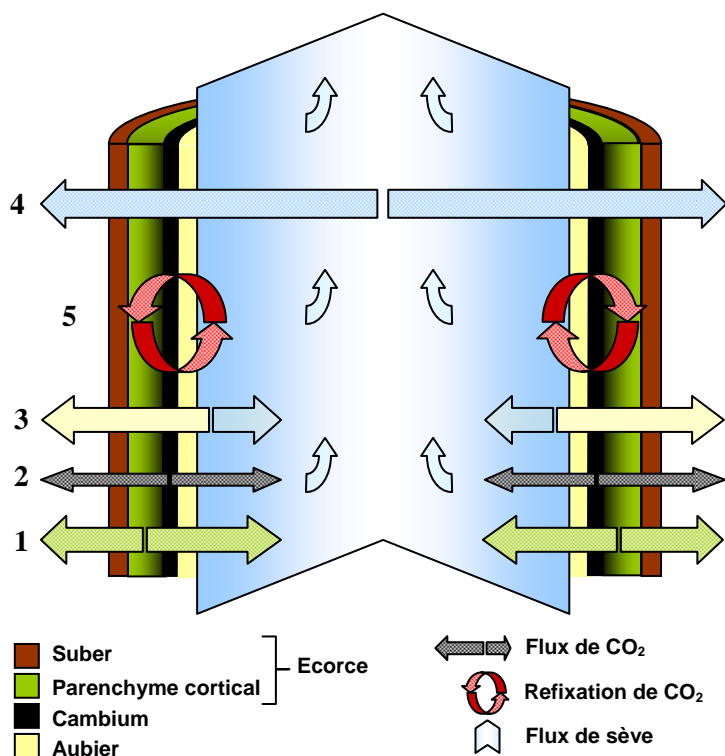
La résistance à la diffusion est dépendante de la composition biochimique de l'écorce (quantités de lignine et subérine) et de son épaisseur (Lendzian, 2006). En fonction de l'espèce et de l'âge de la tige considérée, la conductance du CO<sub>2</sub> à travers l'écorce sera variable : la conductance de CO<sub>2</sub> a été estimée à 0.68 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à travers l'écorce de petites branches de *Pinus monticola* (Cernusak & Marshall, 2000) et à 0.50 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à travers l'écorce de branches de 6 ans de *Betula pendula* (Wittmann *et al.*, 2006).

### • Flux verticaux de CO<sub>2</sub>

Comme spécifié précédemment (voir 2.a, page 7), la variabilité temporelle de la respiration de la tige est principalement expliquée par la croissance des tissus en place et par la température. Le flux de sève n'est généralement pas pris en compte dans la mesure de respiration des tiges. Or, la sève peut drainer une partie du CO<sub>2</sub> respiré vers les compartiments supérieurs de la tige causant des erreurs non négligeables sur l'estimation de la respiration mesurée via les efflux de CO<sub>2</sub> (Hari *et al.*, 1991; Teskey & McGuire, 2002).

Une corrélation négative entre le flux de sève et l'efflux de CO<sub>2</sub> a été montrée pour la première fois sur des tiges excisées de *Pinus densiflora* (Negisi, 1979). D'autres études ont montré également le même type de corrélation *in situ* (Bowman *et al.*, 2005; Gansert & Burgdorf, 2005; McGuire *et al.*,

2007). En supposant un flux transpiratoire maximal de 30 kg d'eau par jour, Gansert & Burgdorf (2005) ont estimé que la baisse de l'efflux de CO<sub>2</sub> causée par un transport vertical de CO<sub>2</sub> pouvait atteindre 40 % pour des grosses branches (Ø = 14 cm) de *Betula pendula*. Sur des tiges coupées de *Platanus occidentalis* et en absence de flux de sève, l'efflux de CO<sub>2</sub> ( $E_A$ , **équation 2**) a été estimé à 1 mol m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> ; pour un flux de sève égal à 1 cm min<sup>-1</sup>,  $E_A$  diminue à 300 mol m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> soit une baisse de l'efflux de CO<sub>2</sub> de 70 % (McGuire *et al.*, 2007). Lorsque le flux de sève est nul (pendant la nuit par exemple), le flux de CO<sub>2</sub> vertical devient quasi nul. Par conséquent, le CO<sub>2</sub> s'accumule et le gradient de concentration causé par son accumulation aboutit à une augmentation de l'efflux de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère. Teskey & McGuire (2002) ont ainsi pu montrer que la dynamique journalière de concentration en CO<sub>2</sub> dans la tige suivait, de façon inverse, celle de l'intensité du flux de sève et que la concentration en CO<sub>2</sub> dans la tige était corrélée linéairement à l'efflux de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère. Le CO<sub>2</sub> respiré par les tiges ou les racines, et véhiculé vers le haut par la sève, pourrait même être assimilé par les feuilles. Bien que la part de carbone assimilée par cette voie soit négligeable sur la quantité totale de CO<sub>2</sub> assimilée par la feuille, de nombreux auteurs confirment cette hypothèse par des expériences de marquage sur des plantes herbacées (Hibberd & Quick, 2002) ou sur les arbres (Zelawski *et al.*, 1970; Stringer & Kimmerer, 1993).



**Figure 5** : représentation schématique des flux de CO<sub>2</sub> dans et à travers la tige. La partie interne de l'écorce (1), le cambium (2) et les rayons ligneux du bois (3) sont les sources principales de CO<sub>2</sub>. Une partie du CO<sub>2</sub> est dégagée vers l'extérieur et une autre est dissoute dans la sève. Plus haut dans la tige, le CO<sub>2</sub> ayant été en partie emporté par le flux xylémien est dégagé (4). La refixation de CO<sub>2</sub> a principalement lieu dans le parenchyme cortical. D'après Teskey *et al.* (2008).

A l'échelle de la branche, il apparaît donc clairement que l'efflux de CO<sub>2</sub> vers l'atmosphère ne semble pas refléter réellement le flux de CO<sub>2</sub> respiré par les cellules de la tige. *In situ*, l'influence du flux de sève sur l'efflux de CO<sub>2</sub> n'est pas toujours constatée car beaucoup de facteurs tels que la température, le stress hydrique, la disponibilité en sucres et la vitesse de flux de sève dans la tige varient d'une espèce à l'autre et d'un site à l'autre. Il faut également nuancer ces observations qui sont surtout valables pour les branches de gros diamètre. En effet, le fort rapport surface sur volume des jeunes tiges de l'année ou d'un an (par rapport à une tige de diamètre plus gros) minimise la contribution du CO<sub>2</sub> xylémien sur l'efflux de CO<sub>2</sub> sur la tige (Wittmann *et al.*, 2006). En revanche, il est tout à fait légitime de penser que dans les tiges plus âgées, et donc de diamètre plus important, la contribution du CO<sub>2</sub> xylémien sur l'efflux de CO<sub>2</sub> de la tige est plus important puisque le xylème peut représenter jusqu'à 80 % du volume total de la tige.

Au sein de la tige, les différentes sources potentielles de CO<sub>2</sub> correspondent principalement aux respirations des différents tissus vivants en place et/ou en croissance (**figure 5**). Une partie de ce CO<sub>2</sub> respiré peut être véhiculé par le flux de sève vers les tissus situés au dessus. Par ailleurs, ce CO<sub>2</sub> peut être réutilisé localement par une assimilation réalisée par les tissus de la tige (refixation), processus rarement pris en compte dans les mesures d'échanges gazeux. Nous allons voir dans la partie suivante comment la tige est capable de photosynthétiser et comment cette assimilation de carbone répond aux différentes conditions environnementales.

## C. La tige : organe photosynthétique

### 1) La tige et la ressource lumineuse

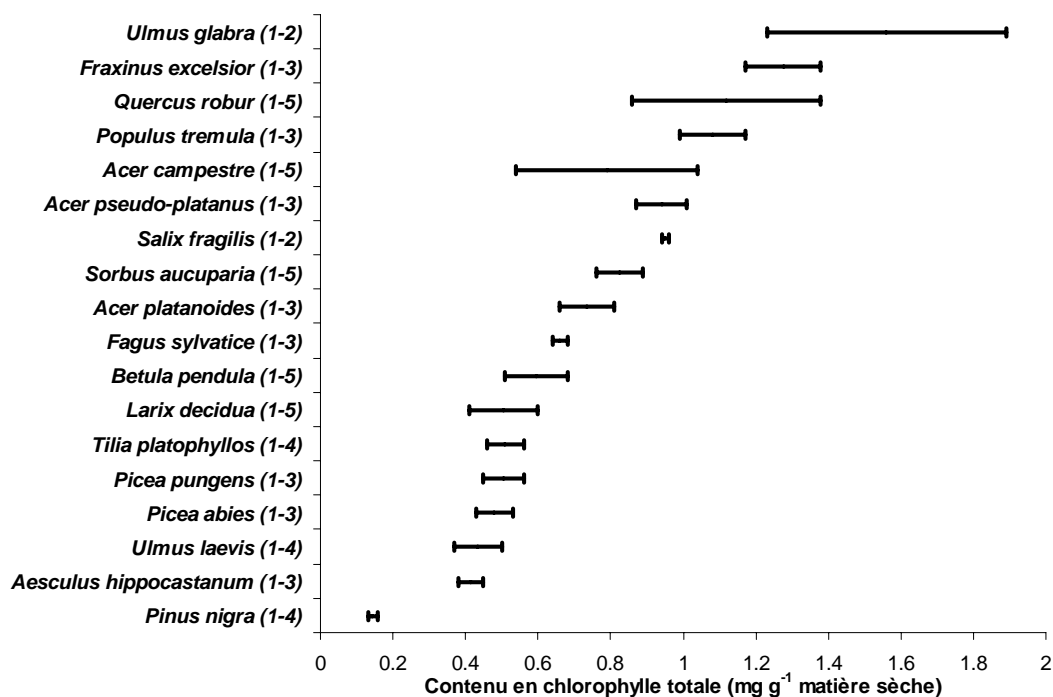
Chez les plantes supérieures, deux ressources majeures sont indispensables à la réalisation de la photosynthèse : le CO<sub>2</sub> et la lumière. A priori, dans la tige, le CO<sub>2</sub> n'est pas une ressource limitante puisque sa concentration est élevée. Si la tige est capable de refixer du CO<sub>2</sub> via la photosynthèse, la présence et la capture de l'énergie lumineuse sont nécessaires. Mais contrairement aux feuilles, la tige possède une écorce constituée en partie de tissus morts (suber) rendant difficile la pénétration de la lumière. Dans ces conditions, est-il possible que la tige possède de la chlorophylle ? Quelles sont les quantités et les qualités de la lumière qui traverse les couches périphériques de la tige ?

#### a) Présence de cellules chlorophylliennes dans la tige

Dans la partie interne de l'écorce se trouve un tissu vert chlorophyllien, le chlorenchyme, qui regroupe notamment le parenchyme cortical et le phelloderme. Les premières découvertes de ces tissus chlorophylliens dans la tige date de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle (Moeller, 1882; Cannon, 1905; Scott, 1907; Cannon, 1908).

##### a.1) Contenu en chlorophylle

Les contenus en chlorophylles (Chl) de la tige sont très variables selon l'espèce, l'âge de la tige, la structure de l'écorce et l'environnement lumineux dans lequel se situe la tige (Pearson & Lawrence, 1958). De nombreuses données sont disponibles dans la littérature, essentiellement sur le contenu en chlorophylle de l'écorce (**figure 7**).



**Figure 6** : variabilité interspécifique de la quantité de chlorophylle contenue dans l'écorce de jeunes tiges d'arbres bien exposés. Les chiffres entre parenthèses indiquent la gamme d'âge représentée en années. D'après Pfanz et al. (2002).

De façon surprenante, il a été montré que lorsque la tige vieillit (entre les 1<sup>ère</sup> et 5<sup>ème</sup> année), plus le contenu en chlorophylle, exprimé en unité de surface, augmente (Aschan *et al.*, 2001; Pfanz *et al.*, 2002). Malgré la baisse de quantité de lumière à travers les tissus de l'écorce (voir a.2), Aschan *et al.* (2001) expliquent ce résultat par une synthèse accrue de chlorophylle lors de la différenciation des tissus au cours de la croissance de la tige.

Le rapport Chl *a* / Chl *b* donne une information sur l'environnement lumineux d'un organe photosynthétique. Par exemple, une feuille d'ombre aura un rapport Chl *a* / Chl *b* proche de 1.8–2.5 alors qu'une feuille de lumière aura un rapport Chl *a* / Chl *b* de 2.5–4.0. Ceci s'explique par le nombre plus important de Chl *b* à l'ombre (augmentation du nombre d'antennes collectrices, plus riches en Chl *b* qu'en Chl *a*). Comme on pourrait s'y attendre, le rapport Chl *a* / Chl *b* mesuré dans l'écorce d'une tige est faible, variant de 1.8 et 2.7 selon l'espèce considérée (Pfanz *et al.*, 2002), ce qui est tout à fait comparable à des feuilles d'ombre. En revanche, il semblerait que ce rapport ne soit pas dépendant de l'âge (Pfanz *et al.*, 2002).

### **a.2) Ultrastructure des chloroplastes et distribution de la chlorophylle dans la tige**

Au vu des données de la littérature qui concernent presque toujours l'écorce (**figure 6**), le chlorenchyme semble être l'unique tissu possédant de la chlorophylle. Pourtant, on observe, par microscopie électronique (MET), que des cellules plus profondes des jeunes tiges possèdent des chloroplastes (Ames & Tepper, 1978; Larcher *et al.*, 1988). L'ultrastructure des chloroplastes des tiges est généralement similaire à celle des chloroplastes de feuilles d'ombre, avec notamment une densité et une largeur de grana importantes (Ames & Tepper, 1978; Larcher *et al.*, 1988; Langenfeld-Heysler, 1989). Les résultats de comparaisons de l'ultrastructure des chloroplastes de l'écorce à celle des chloroplastes des rayons ligneux du bois divergent toutefois d'une étude à l'autre. Aucune différence n'a été observée entre l'écorce, le xylème et le cœur de tiges de hêtre (Larcher *et al.*, 1988) alors qu'une augmentation de la densité de grana, du phelloderme vers le chlorenchyme, puis une baisse, du chlorenchyme vers le cœur, a été observée pour les tiges d'if (Buns *et al.*, 1993) et d'épicéa (Langenfeld-Heysler, 1989).

Pour de jeunes tiges, les études montrent que plus on s'enfonce dans la tige et plus la taille des grains d'amidon des chloroplastes augmente (Szujko-Lacza *et al.*, 1971; Ames & Tepper, 1978). Cette observation est contraire à ce qui est généralement observé pour les feuilles qui accumulent de l'amidon lorsqu'elles sont "feuilles de lumière" ou qui ont peu de grains d'amidon lorsqu'elles sont "feuilles d'ombre" (Lichtenthaler & Meier, 1984). Les auteurs expliquent l'accumulation d'amidon au centre de la tige par des transferts radiaux de photosynthétats foliaires (depuis le xylème) ou de photosynthétats du chlorenchyme (depuis l'écorce) venant alors alimenter les cellules profondes de la tige (Pfanz *et al.*, 2002).

Il n'y a pas d'études qui portent sur la distribution de la chlorophylle dans les tiges d'arbres. L'utilisation du MET, pour visualiser les chloroplastes, limite le champ d'observation rendant ainsi difficile une estimation correcte sur une section entière de tige.

## **b) La lumière dans la tige**

La lumière est une ressource indispensable au processus de photosynthèse car elle rend possible les sauts d'énergie dans la chaîne de photophosphorylation, i.e. lors de la photolyse de l'eau (via l'excitation du photosystème II) et lors de l'excitation du photosystème I. Ces processus complexes se déroulent au niveau des membranes internes des chloroplastes.

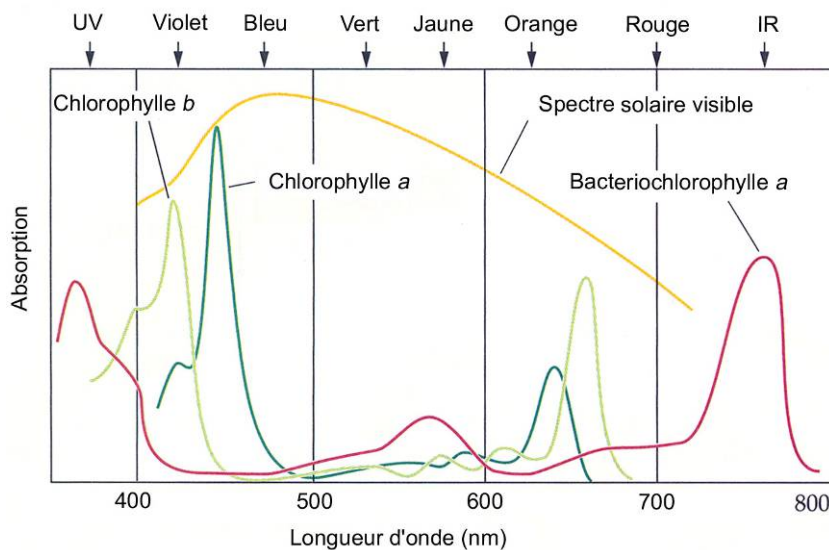


Figure 7 : spectres d'absorption des chlorophylles a et b extraits de feuilles. D'après Buchanan et al. (2002).

On sait que les feuilles absorbent une partie de l'énergie lumineuse dans le rouge et dans le bleu (figure 7) grâce aux chlorophylles a et b qui constituent, entre autre, les molécules des antennes collectrices de lumière situées sur les photosystèmes I et II des chloroplastes. Qu'en est-il pour les tiges ?

### b.1) Pénétration et qualité de la lumière dans la tige

Le chlorenchyme diffère du parenchyme palissadique des feuilles par le fait notamment qu'il est recouvert d'un périderme ou d'un tissu mort (suber) alors que le parenchyme palissadique n'est recouvert que de l'épiderme et de la cuticule foliaire (figure 8) (Schaedle, 1975).

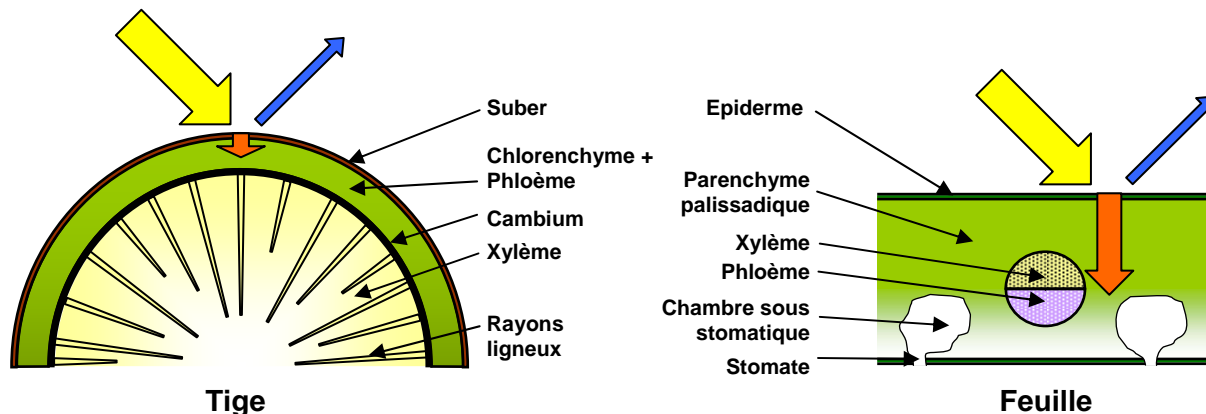


Figure 8 : comparaison schématique des structures d'une tige et d'une feuille. Une petite partie de la lumière incidente (flèche jaune) est réfléchi au niveau du suber ou de l'épiderme (flèche bleu) et une grande partie est absorbée par les tissus (flèche orange) et éventuellement transmise à travers l'organe. Voir le texte pour les détails.

La pénétration de la lumière à travers l'écorce est faible, non homogène et variable en fonction de la longueur d'onde (Pfanzer et al., 2002). En général, plus la longueur d'onde est grande, et donc de faible énergie, plus la transmittance à travers l'écorce est grande. Ainsi, dans le PAR<sup>4</sup>, le bleu est fortement absorbé par les couches périphériques de l'écorce de la tige alors que le rouge pénètre plus en profondeur (Kharouk et al., 1995; Solhaug et al., 1995). Chez *Betula pubescens*, la transmission du rouge à 725 nm est meilleure qu'à 665 nm (Kauppi, 1991). A titre de comparaison, pour une feuille d'épinard, 90 % de la lumière dans le bleu (450 nm) et le rouge (680 nm) est absorbée par les 140

<sup>4</sup> Photosynthetically Active Radiation : radiations photosynthétiquement actives (de 400 à 700 nm)

premiers micromètres du mésophile foliaire (Vogelmann, 1993), distance qui correspond au passage à travers les deux couches de cellules palissadiques.

## b.2) Quantité de lumière

La quantité de lumière qui atteint le chlorenchyme dépend des caractéristiques des couches supérieures qui constituent l'écorce. Plus la tige est âgée, plus l'écorce prend de l'importance en épaisseur et plus la quantité de lumière diminue au fur et à mesure qu'elle traverse l'écorce (Aschan *et al.*, 2001). Dans le cas de tiges âgées, 0–3 % de la lumière incidente atteint le chlorenchyme de la tige (**tableau 2**). Il a également été montré que la présence de lichens sur l'écorce de *Populus tremula* réduisait la transmittance mesurée au niveau du chlorenchyme de 10–50 % (Solhaug *et al.*, 1995).

Espèce	Age de la tige (ans)	Transmittance à travers le suber (%)	Référence
<i>Betula pendula</i>	1	26	Wittmann <i>et al.</i> (2006)
<i>Betula pubescens</i>	1	20 (à 665 nm)	Kauppi (1991)
	20	9 (à 665 nm)	
<i>Fagus sylvatica</i>	1	6	Wittmann <i>et al.</i> (2001)
<i>Fraxinus excelsior</i>	1	50	Pfanz <i>et al.</i> (2002)
<i>Fraxinus ornus</i>	1	10	Szujko-Lacza <i>et al.</i> (1970)
	55	1	
<i>Populus tremula</i>	1	26	Wittmann <i>et al.</i> (2001)
<i>Populus tremuloides</i>	-	5-15	Pfanz <i>et al.</i> (2002)
<i>Quercus pubescens</i>	1	60	Szujko-Lacza <i>et al.</i> (1970)
	10	3	
	13	0	

**Tableau 3** : transmittances (en pourcentage de la lumière incidente) mesurées à travers le suber de tiges de différents âges et de différentes espèces d'arbres. Sauf indiqué entre parenthèses, la gamme de longueur d'onde utilisée pour la lumière incidente était dans le visible.

La lumière n'est pas totalement stoppée au niveau du chlorenchyme. Malgré une intensité très faible, la lumière peut atteindre les couches profondes des tiges, au niveau du bois. Par exemple, pour des tiges d'*Atriplex confertifolia* (arbuste désertique sempervirent) de 6 mm de diamètre, la transmission de la lumière sur tout le spectre visible a été mesurée à plusieurs profondeurs (Wiebe *et al.*, 1974) : 1–5 % passe l'écorce, 0.2–1 % passe à travers le chlorenchyme, 0.01–0.2 % atteint la partie périphérique du xylème secondaire (le bois). Chez *Fagus sylvatica*, la transmission d'une source lumineuse rouge (665 nm) à travers écorce plus chlorenchyme est d'environ 0.01 % pour une tige d'un an ( $\varnothing = 1.3$  mm) et atteint 0.000003 % pour une tige de cinq ans ( $\varnothing = 6.8$  mm) et  $10^{-8}$  % pour une tige de 16 ans ( $\varnothing = 30$  mm) (Pfanz *et al.*, 2002).

D'autres voies de passage de la lumière ont été étudiées. Les lenticelles, présentes à la surface de la tige et d'une taille unitaire d'environ 15  $\mu\text{m}$  chez *Alnus glutinosa* (Buchel & Grosse, 1990), ont pour rôle principal l'échange de vapeur d'eau et de gaz entre l'atmosphère et la plante (Lendzian, 2006). Les lenticelles sont des structures exemptes de suber qui s'est fissuré au cours de la formation du tissu. Les lenticelles pourraient être a priori des voies de passage privilégiées pour la lumière. Pourtant, quelques études ont révélé que la lumière était plus fortement absorbée et réfléchi au niveau des lenticelles comparée à l'écorce adjacente, et qu'il n'y avait que 0.2 à 12.1 % de la lumière incidente qui était transmise jusqu'au chlorenchyme sous-jacent (Wiebe *et al.*, 1974; Manetas & Pfanz, 2005).

De la même façon que les fibres scléreuses<sup>5</sup> dans les feuilles (Karabourniotis *et al.*, 2000), la tige, peut jouer le rôle de conducteur de lumière à travers les tissus vasculaires, i.e. xylème et phloème. En éclairant perpendiculairement la tige de différentes espèces ligneuses et en mesurant la lumière captée au niveau de la section de tige, quelques centimètres plus bas, Sun *et al.* (2003) ont pu montrer que

<sup>5</sup> Fibres scléreuses : type de sclérenchyme (tissu de soutien) composé de cellules très allongées en fuseau réparties en anneau continu sous l'épiderme, proche du cylindre central ou regroupées en îlots.

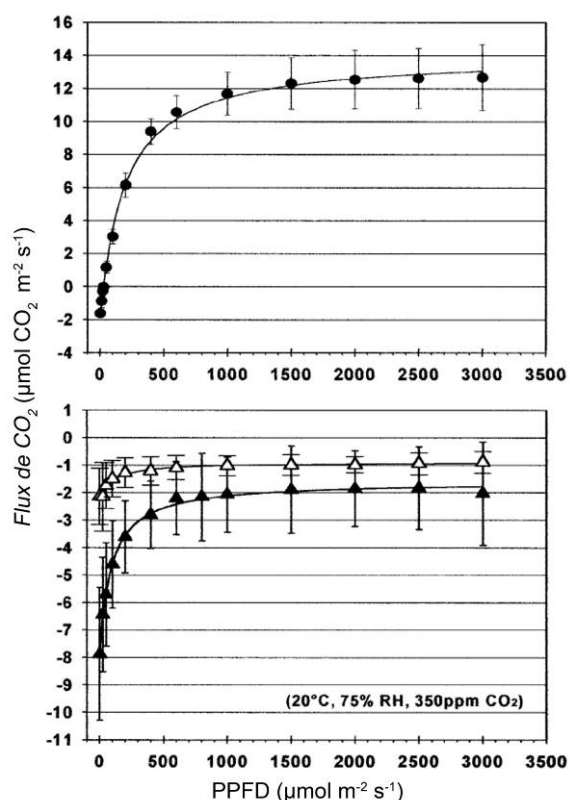


certaines gammes de longueurs d'onde (dans le rouge) étaient transmises jusqu'aux organes sous-jacents, via les vaisseaux de xylème et de phloème.

## 2) Ecophysiologie de la photosynthèse des tiges

### a) Réponses aux conditions environnementales

#### a.1) Réponse à la lumière



**Figure 9 :** courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière de feuille (en haut, cercles pleins), de tige l'année (en bas, triangles pleins) et de tige d'un an (en bas, triangles ouverts) de peuplier. PPF : densité de flux de photon dans le PAR. D'après Aschan *et al.* (2001).

La réponse de la photosynthèse des feuilles à la lumière est bien connue. Plus la quantité de lumière incidente est importante, plus le flux de CO<sub>2</sub> entrant dans la feuille est important (**figure 9**). Lorsqu'une tige est transférée de l'obscurité à la lumière, le flux de CO<sub>2</sub> sortant (supposé refléter la respiration s'il est mesuré à l'obscurité) diminue (en valeur absolue) pour se rapprocher de zéro, et la courbe de réponse est typique de ce qui est observé sur une feuille d'ombre, i.e. photosynthèse maximale relativement faible mais rapidement atteinte (**figure 9**).

Malgré l'augmentation de PPF (densité de flux de photon dans le PAR), le flux de CO<sub>2</sub> mesuré pour une tige devient très rarement positive. Pour une tige de l'année, il atteint généralement des valeurs proches de -2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à PPF saturant (Cernusak & Marshall, 2000; Aschan *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2001; Damesin, 2003; Wittmann *et al.*, 2005).

Avec l'âge, le flux de CO<sub>2</sub> maximum diminue encore (en valeur absolue) mais reste généralement stable autour de -1 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Aschan *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2001).

C'est lorsque la tige est la plus jeune qu'une assimilation nette maximale positive peut être observée. A cet âge, les parties périphériques de l'écorce ne sont pas très développées. La tige apparaît très verte et la lumière pénètre en plus grande quantité et plus profondément dans la tige.

Chez le hêtre, un mois après le débourrement, le flux de CO<sub>2</sub> mesurée à PPF saturant sur les tiges de l'année était comprise entre 0 et 1 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Damesin, 2003).

Puisque le flux de CO<sub>2</sub> n'est presque jamais positif chez la tige, les auteurs préfèrent toutefois calculer l'assimilation brute qui correspond à la réduction du flux de CO<sub>2</sub> de la tige observé lorsque celle-ci est transférée de l'obscurité ( $R_d$ ) à la lumière ( $R_l$ ) (**équation 3**) :

$$A_g = |R_d - R_l|$$

$R_d$ : flux de CO<sub>2</sub> mesuré à l'obscurité, µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 $R_l$ : flux de CO<sub>2</sub> mesuré à lumière saturante, µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

Equation 3 : équation permettant le calcul de l'assimilation brute appelée  $A_g$  ou  $P_g$

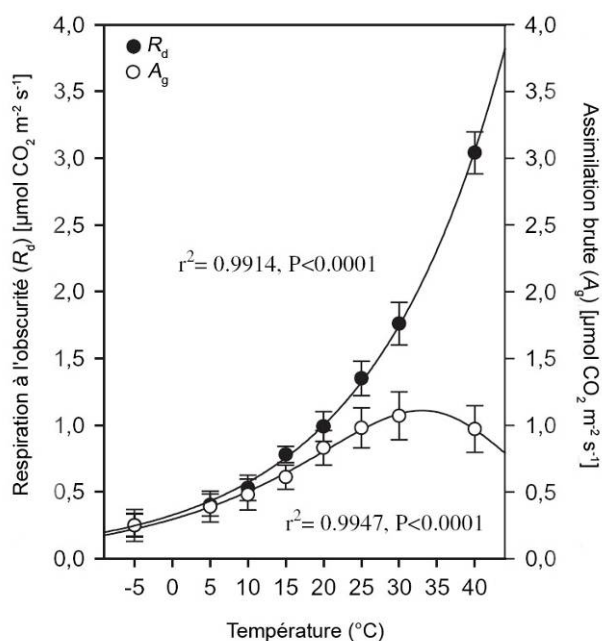
## a.2) Réponse à la température

Concernant la réponse de la photosynthèse des tiges à la température, les données sont assez rares.

De même que la réponse de la respiration à la température (voir **équation 1**), la réponse de la photosynthèse à la température suit une loi d'Arrhenius de type exponentielle jusqu'à 30 °C (**figure 10**). Un optimum est atteint vers 30-35 °C à partir duquel notamment les processus photochimiques (flux maximal d'électron, vitesse de carboxylation de la Rubisco) déclinent.

Il apparaît également que le rendement quantique opérationnel des PSII ( $F_v'/F_m'$ ), atteint un optimum à 35°C pour la tige de hêtre alors qu'il est égal à 30°C pour la feuille (Wittmann & Pfanz, 2007). Les auteurs de cette étude suggèrent que cette différence d'optimum de température de la photosynthèse est le reflet d'un métabolisme carboné différent entre la tige et la feuille, peut-être intermédiaire entre les métabolismes C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>.

En effet, les plantes à métabolisme C<sub>4</sub> affichent un optimum de température pour la photosynthèse supérieur à celui des plantes à métabolisme C<sub>3</sub>. Ceci est dû (1) au processus de concentration de CO<sub>2</sub> qui inhibe la fonction oxygénase de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) et (2) à la plus forte stabilité de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) aux hautes températures par rapport à la Rubisco.

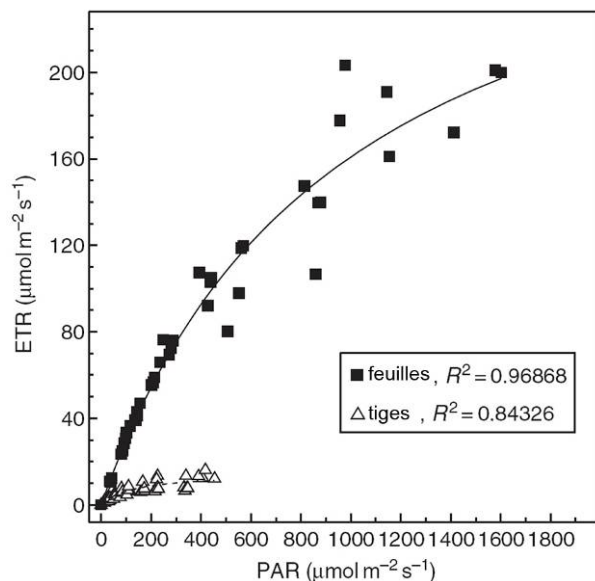


**Figure 10** : courbes de réponse de  $R_d$  et  $A_g$ , (mesurée à PAR saturant) à la température effectuées sur des tiges de 1-2 ans de hêtre. D'après Wittmann & Pfanz (2007).

## b) Photochimie

L'utilisation des systèmes d'échanges gazeux pour la mesure de l'assimilation de CO<sub>2</sub> par la tige peut être critiquable. Le maintien de la température pendant la mesure est essentiel afin de contrôler les flux respiratoires provenant de la majorité du tissu étudié, les tissus photosynthétisants (chlorenchyme) n'en représentant qu'une petite part. De plus, la mesure des échanges gazeux sur de jeunes tiges, à entre-nœuds courts, nécessite de couper certaines feuilles afin de n'avoir que la tige dans la chambre, ce qui induit alors une fuite de CO<sub>2</sub> par les blessures ("wound respiration").

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne *in vivo* permettent de s'abstenir de ces problèmes puisqu'elles utilisent des outils non intrusifs et applicables sur de très faibles surfaces tissulaires (Krause & Weis, 1991). Ces mesures renseignent sur les réactions primaires associées au transport d'électron à travers la chaîne de photophosphorylation chlorophyllienne (qui a lieu dans la membrane thylakoïdienne), via notamment le photosystème II (PSII), une des premières cibles en cas de stress.



**Figure 11** : courbes de réponse du flux linéaire d'électrons au travers du PSII (ETR) en fonction de l'intensité lumineuse (PPFD dans le PAR) effectuées sur des feuilles et tiges de *Prunus cerasus*. D'après Manetas (2004).

En conditions contrôlées en laboratoire ou stables sur le terrain, la vitesse du flux linéaire d'électrons au travers du PSII (ETR pour Electron Transport Rate) est positivement corrélée à la fixation de CO<sub>2</sub> (Genty *et al.*, 1989). Comparé à la feuille, le chlorenchyme des tiges montre une saturation de l'ETR dès 400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (**figure 11**), ce qui est caractéristique de l'adaptation des chloroplastes des tiges à l'ombre (Manetas, 2004; Ivanov *et al.*, 2006; Kotakis *et al.*, 2006).

Chez les tiges, à faible PPFD (50–150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), le quenching non photochimique (qN ou NPQ), indiquant une perte d'énergie calorique, est très important comparé aux feuilles (Manetas, 2004). Associée au fait que le chlorenchyme des tiges souffre d'un nombre important de PSII inactifs, cette observation expliquerait le faible ETR mesuré et suppose par conséquent une faible activité du photosystème I (PSI). Bien qu'en quantité largement plus faible dans la tige que dans la feuille (Ivanov *et al.*, 2006), les pools de PSI sont suffisamment actifs et non limitants, supposant ainsi qu'un flux cyclique d'électrons est actif à travers le PSI (Kotakis *et al.*, 2006). Comparé aux feuilles et à PPFD équivalent, le flux cyclique d'électron est effectivement 2 à 4 fois plus important pour le chlorenchyme de tiges de *Eleagnus angustifolius* (Kotakis *et al.*, 2006). Le maintien d'un flux cyclique d'électrons important autour du PSI dans l'écorce des tiges compenserait la faible activité du PSII, apportant une voie supplémentaire à la fourniture d'ATP (Manetas, 2004).

De fortes concentrations en CO<sub>2</sub> abaissent également le rendement quantique de la photochimie au niveau des PSII (mesuré via  $\phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ ) et l'ETR. Bligny *et al.* (1997) ont montré une baisse des caractéristiques photochimiques de feuilles de Pois éclairées et soumises à une concentration en CO<sub>2</sub> de 15%. Chose intéressante, le rendement quantique maximal des PSII ( $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ) ne change pas, indiquant que les effets observés sur le flux d'électron ne sont pas dû au CO<sub>2</sub> en soi mais, indirectement, à l'acidification du stroma chloroplastique néfaste au bon fonctionnement des enzymes du cycle de Calvin-Benson-Bassham.

Ces observations sont a priori transposables à la tige puisque les concentrations en CO<sub>2</sub> peuvent être très importantes (voir paragraphe B.2.b.1, page 8). Ainsi, Manetas (2004) montre l'effet néfaste mais totalement réversible d'une forte concentration en CO<sub>2</sub> sur les processus photochimiques de la photosynthèse des tiges :  $\phi_{PSII}$  et ETR, mesurés à PPFD = 500 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sur le chlorenchyme de jeunes tiges de *Prunus cerasus*, baissent de 70 % lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> passe de 0.036 à 20 % de CO<sub>2</sub>.

## c) Assimilation de CO<sub>2</sub> par la photosynthèse des tiges : réalité ou fiction ?

Comme nous l'avons vu en toute fin de la partie B, il existe différentes issues au CO<sub>2</sub> respiré par les tissus de la tige : l'efflux vers l'atmosphère par diffusion, le transfert vertical vers les tissus supérieurs et enfin, la refixation par la photosynthèse des tiges. Les paragraphes qui suivent détaillent le calcul de la refixation et les données de la littérature montrant que l'assimilation existe (c.1) et discutent également de l'existence réelle de la photosynthèse des tiges (c.2).

### c.1) Refixation de CO<sub>2</sub> par la photosynthèse des tiges

Afin d'estimer l'importance de cette dernière, Cernusak & Marshall (2000) ont, pour la première fois, calculé un taux de refixation de carbone. La refixation est le processus de recapture du carbone perdu par respiration et refixé par la photosynthèse de la tige (**équation 4**) :

$$\% \text{ refixation} = \left( \frac{R_d - R_l}{R_d} \right) \times 100$$

$R_d$ : flux de CO<sub>2</sub> mesuré à l'obscurité,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$   
 $R_l$ : flux de CO<sub>2</sub> mesuré à lumière saturante ou assimilation nette,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Equation 4 : équation permettant le calcul du pourcentage de refixation

Quand le pourcentage de refixation est supérieur à 100 %, ce qui est rare, cela signifie qu'une assimilation nette positive est mesurée, autrement dit que du CO<sub>2</sub> extérieur est incorporé par la photosynthèse de la tige. Chez *Pinus monticola*, Cernusak & Marshall (2000) ont pu montrer que le taux de refixation passait de 10 % pour un PPFd de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  à 79 % pour un PPFd saturant. Le taux de refixation varie en fonction de l'âge de l'organe, de la période de mesure et de l'espèce considérée (**tableau 3**).

Espèce	Age de la tige (années)	Refixation maximale (%)	Auteurs
<i>Acer rubrum</i>	0-1	31 (hiver)	(Coe & McLaughlin, 1980)
<i>Cornus florida</i>	0-1	79 (hiver)	(Coe & McLaughlin, 1980)
<i>Eucalyptus miniata</i>		55	(Cernusak <i>et al.</i> , 2006)
<i>Fagus crenata</i>	5	98	(Han & Suzaki, 1981)
<i>Fagus sylvatica</i>	0-1	80-90	(Wittmann <i>et al.</i> , 2001)
	0-1	60-110	(Damesin, 2003)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	0-1	23 (hiver)	(Coe & McLaughlin, 1980)
<i>Pinus monticola</i>	3-4	76	(Cernusak & Marshall, 2000)
<i>Pinus sylvestris</i>	55-60	54	(Kaipiainen <i>et al.</i> , 1998)
<i>Populus tremula</i>	0-1	60-80	(Wittmann <i>et al.</i> , 2001)
<i>Populus tremuloides</i>	0-1	80	(Aschan <i>et al.</i> , 2001)
	6-8	90 (hiver)	(Foote & Schaedle, 1976a)
	6-8	92 (été)	
<i>Prunus persica</i>	0-1	66	(Alessio <i>et al.</i> , 2005)
<i>Quercus alba</i>	0-1	19 (hiver)	(Coe & McLaughlin, 1980)

**Tableau 4** : variabilité interspécifique du pourcentage de refixation maximal (mesuré à éclairement saturant) pour des tiges d'âges variables.

Dans l'étude de Damesin (2003), les taux de refixation maximum (> 100 %) ont été atteints peu après le débourrement et pendant l'hiver lorsque les forces de puits ne sont pas suffisamment ou pas du tout compensées par l'assimilation foliaire. A l'échelle de l'année, cet auteur a calculé que la tige de un an de hêtre assimilait 0.2 g de carbone (et respirait 0.5 g de carbone) ce qui compensait la respiration d'entretien ( $R_m$ ).

Du fait de la réponse exponentielle de la respiration à la température et d'un optimum atteint autour de 30-35°C pour la photosynthèse (**figure 10**), la refixation de carbone par la tige décroît avec l'augmentation de la température. Pour la jeune tige de hêtre, le pourcentage de refixation chute de 100 % à seulement 25 % lorsque la température augmente de 0°C à 40°C (Wittmann & Pfan, 2007). Les réponses de la respiration et de l'assimilation à la température sont malgré tout relativement proche pour une gamme de températures de -5°C et 5°C (**figure 10**), ce qui explique les taux élevés de refixation en hiver (Damesin, 2003; Wittmann & Pfan, 2007).

Comme nous venons de le voir, le flux de CO<sub>2</sub> sortant d'une tige d'arbre baisse lorsque celle-ci est transposée de l'obscurité à la lumière et cette baisse serait due à la refixation de CO<sub>2</sub> par des processus photosynthétiques. Cette affirmation est discutable puisque d'autres processus liés aussi au métabolisme carboné sont dépendants de la lumière :

- l'inhibition de la respiration à la lumière, qui peut induire des erreurs sur l'estimation sur la photosynthèse brute réelle des tiges,
- la photorespiration, qui peut agir positivement sur l'efflux de CO<sub>2</sub> à la lumière.

### **c.2) Processus potentiellement impliqués dans la réponse de la photosynthèse des tiges à la lumière**

#### **• Photorespiration**

L'O<sub>2</sub> est un inhibiteur compétitif à la fixation de CO<sub>2</sub> par la Rubisco. La fonction d'oxygénation est liée au processus de photorespiration qui fait intervenir le chloroplaste, le peroxysoxe et la mitochondrie. Bien que la photorespiration soit connue pour intervenir dans le métabolisme azoté (Madore & Grodzinski, 1984) ou encore dans la dissipation de l'excès d'ATP et de pouvoir réducteur en cas de stress photo-oxydatif (Kozaki & Takeba, 1996), elle reste néanmoins un processus qui se déroule sans fixation nette de carbone.

L'hypothèse d'une contribution positive de la photorespiration dans l'efflux de CO<sub>2</sub> à la lumière (voir **équation 3**) n'est pas à exclure. De nombreux auteurs ont toujours supposé que la photorespiration était négligeable voire absente, en raison de la forte concentration en CO<sub>2</sub> de la tige et de la faible concentration en O<sub>2</sub> aboutissant à un rapport O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en faveur de la fonction de carboxylation de la Rubisco (Schaedle, 1975; Foote & Schaedle, 1976b; Pfan *et al.*, 2002; Damesin, 2003).

Au niveau du chlorenchyme, la concentration en CO<sub>2</sub> est de 0.06 à 0.17 % soit jusqu'à six fois plus importante que dans la feuille (Cernusak & Marshall, 2000; Wittmann *et al.*, 2006). Par ailleurs, les résultats d'efflux de CO<sub>2</sub> réalisés à lumière ( $R_l$ ) puis à l'obscurité ( $R_d$ ) sur de jeunes tiges de *Betula pendula* sont identiques à des concentrations en oxygène de l'air de 20 % d'O<sub>2</sub> ou 2 % d'O<sub>2</sub> (Wittmann *et al.*, 2006). Sachant que la concentration en oxygène détermine fortement la voie photosynthétique ou photorespiratoire privilégiée par la Rubisco, ces résultats montrent par conséquent que la photorespiration ne joue pas un rôle important dans l'efflux de CO<sub>2</sub> à la lumière par les tiges des arbres.

#### **• Inhibition de la respiration à la lumière**

De nombreuses études ont montré sur les feuilles que la respiration mitochondriale (supposée être  $R_d$  dans l'**équation 5**) est diminuée de 16 à 77 % lorsqu'elle est mesurée à la lumière (Brooks & Farquhar, 1985; Krömer, 1995; Hoefnagel *et al.*, 1998; Atkin *et al.*, 2000). Cette inhibition est associée à l'inhibition de nombreux mécanismes biochimiques dont le principal est très certainement celui du cycle de Krebs (Atkin *et al.*, 2000; Tcherkez *et al.*, 2005). On peut alors se demander si la baisse de l'efflux de CO<sub>2</sub> constatée à la lumière chez la tige correspond réellement à une refixation de CO<sub>2</sub> par la photosynthèse ou alors s'il ne s'agit pas simplement d'une inhibition de la respiration à l'obscurité.

Aucune étude ne s'est penchée sur l'estimation de la respiration à la lumière par les tiges, afin notamment de connaître l'impact sur la photosynthèse des tiges. Pour estimer la respiration à la

lumière, la technique de Peisker & Appel (2001) nécessitant l'établissement de courbes de réponses  $A/c_i$  réalisées à différentes intensités lumineuses ne sont pas applicables sur une tige. En effet, la source de  $\text{CO}_2$  utilisée pour la photosynthèse des tiges (issue de la respiration par refixation) ainsi que la vitesse de diffusion du  $\text{CO}_2$  à travers l'écorce ne sont pas comparables à ce qu'on a l'habitude de voir chez une feuille.

Une autre méthode basée sur l'estimation du flux d'électron a été utilisée pour savoir s'il y a ou non inhibition de la respiration à la lumière chez la tige ligneuse.

Le transport d'électrons photosynthétiques actionne les cycles de réduction (PCR) et d'oxydation (POR) du carbone (premières étapes associées à la Rubisco) et tout autre puits d'électrons tel que la réduction de l'azote. Une méthode basée sur la fluorescence chlorophyllienne permet d'estimer le flux total d'électrons à la différence d'une méthode basée sur les échanges gazeux. En effet, cette méthode ne peut fournir qu'une estimation du flux d'électrons nécessaire à la réduction du carbone et, si la concentration en  $\text{CO}_2$  dans le chloroplaste est connue avec précision, à l'oxydation du carbone.

En l'absence de photorespiration et sous conditions optimales, sans stress, la photosynthèse est le seul puits métabolique d'électrons. Ainsi, la vitesse du flux d'électron estimé par les mesures d'échanges gazeux ( $\text{ETR}_g$  ou  $J_g$ ) est égale à celle estimée par les mesures de fluorescence ( $\text{ETR}_f$  ou  $J_f$ ) (Loreto *et al.*, 1994). Nous l'avons vu dans le point précédent, la photorespiration ne joue pas un rôle important dans la tige et on devrait avoir  $\text{ETR}_g = \text{ETR}_f$ . Quelconque différence entre  $\text{ETR}_f$  et  $\text{ETR}_g$  signifierait que la baisse d'efflux de  $\text{CO}_2$  des tiges à la lumière n'est pas uniquement due à la refixation par la photosynthèse des tiges. S'il y a inhibition de la respiration à la lumière, on devrait même avoir  $\text{ETR}_f < \text{ETR}_g$ .

Sous des conditions de non photorespiration, i.e.  $[\text{O}_2] = 20$  mbar, Wittman *et al.* (2006) ont mesuré  $\text{ETR}_g$  et  $\text{ETR}_f$  sur de jeunes tiges de bouleau. Ces auteurs ont montré que  $\text{ETR}_f > \text{ETR}_g$ . Les auteurs expliquent (1) qu'on peut écarter toute intervention d'une inhibition de la respiration dans la baisse de l'efflux de  $\text{CO}_2$  à la lumière et (2) que la différence observée entre  $\text{ETR}_f$  et  $\text{ETR}_g$  provient alors de la résistance à la diffusion du  $\text{CO}_2$ , qui contribuerait ainsi à une sous-estimation de  $\text{ETR}_g$ . Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont mesuré les échanges d' $\text{O}_2$  entre l'écorce isolée de tiges de bouleau et l'atmosphère, éliminant ainsi toute résistance à la diffusion et ont montré ainsi que  $\text{ETR}_g$  était bien égal à  $\text{ETR}_f$ .

Pour conclure, il semble donc que la photorespiration et l'inhibition de la respiration à la lumière n'interviennent pas dans l'efflux de  $\text{CO}_2$  à la lumière. La baisse d'efflux de  $\text{CO}_2$  observée lorsque la tige passe de l'obscurité à la lumière correspond donc principalement à la refixation de carbone par les mécanismes photosynthétiques de la tige.

## D. Objectifs de la thèse

Les tiges des arbres ont la particularité d'être situées au cœur des échanges de matière et d'énergie entre les racines et les feuilles. Les fonctions principales de la tige sont d'assurer le soutien de l'arbre et d'apporter les éléments nutritifs des racines aux organes en croissance. Mais nous avons vu que la tige est aussi capable d'assimiler du carbone en refixant une partie du CO<sub>2</sub> respiré.

D'un point de vue écophysio-physiologique, nous avons lors du chapitre précédent que la photosynthèse des tiges présente des caractéristiques proches de la photosynthèse de feuilles d'ombres. Il a été observé notamment que l'assimilation nette répond positivement à l'augmentation de l'intensité lumineuse, que la tige présente une faible quantité de chlorophylles et une machinerie photosynthétique intacte, prête à capter la faible quantité de lumière atteignant le tissu photosynthétique, i.e. le chlorenchyme.

Concernant les échanges gazeux, les données de la littérature portent sur des espèces d'arbres variées et montrent une grande variabilité dans l'estimation de l'assimilation de carbone par la tige. Les méthodologies, les outils et les conditions de mesures varient d'une étude à l'autre. Alors que les tissus profonds de la jeune tige peuvent également refixer du CO<sub>2</sub>, certaines études se contentent pourtant de ne prendre en compte que l'écorce comme tissu photosynthétique quel que soit l'âge du tissu. D'autre part, les mesures ne sont pas réalisées pendant la même période de l'année. Il est donc difficile de pouvoir comparer aisément les différents paramètres mesurés entre les espèces.

**Est-ce que cette variabilité des échanges gazeux indique une réelle variabilité interspécifique et/ou est-elle due aux différentes méthodologies employées ? Si une variabilité interspécifique de la photosynthèse existe, peut-elle être expliquée par une variabilité des caractères structuraux ou biochimiques de la tige ?**

Les données disponibles sur la photosynthèse des tiges n'ont toujours concerné qu'une période restreinte de la saison de végétation, l'été pour la plupart des cas. Pourtant, la tige évolue au cours de la saison de végétation avec des modifications structurales importantes. La pénétration de la lumière est de plus en plus difficile ce qui suppose que le chlorenchyme soit à terme le seul tissu photosynthétique. Mais des expériences de marquage au <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> indiquent que les cellules situées plus en profondeur, dans les rayons xylémiens et dans le parenchyme médullaire, sont capables de fixer du CO<sub>2</sub> (Wiebe, 1975; Langenfeld-Heyser, 1989). Cette fixation est supposée être attribuée à la Rubisco et la PEPC, deux enzymes carboxylantes liées, de près ou de loin, au processus de fixation du carbone dans la photosynthèse foliaire. La Rubisco, l'enzyme la plus abondante chez la plante, fixe le CO<sub>2</sub> dans le chloroplaste au niveau du cycle de Calvin. La PEPC intervient dans la voie anaplérotique chez les plantes à métabolisme C<sub>3</sub> et comme première enzyme fixatrice de carbone chez les plantes à métabolisme C<sub>4</sub>. Ces deux enzymes n'ont été étudiées cependant qu'une seule fois dans les tiges : dans l'écorce de Peuplier pour la Rubisco (Schaedle & Brayman, 1986) et dans le bois de Robinier pour la PEPC (Höll, 1974).

**Quelle est la dynamique de la photosynthèse des jeunes tiges à l'échelle de l'année et son lien notamment avec les activités Rubisco et PEPC ? Comment évolue la distribution des tissus chlorophylliens de la tige au cours de la saison ?**

Il a récemment été montré que les cellules qui entourent les vaisseaux de xylème de tiges et pétioles de tabac montrent de fortes activités d'enzymes caractéristiques d'un métabolisme C<sub>4</sub> (Hibberd & Quick, 2002). Associés à la présence de cellules chlorophylliennes dans les cellules profondes de la tige, ces résultats ont soulevé l'hypothèse d'un métabolisme de type C<sub>4</sub> dans les tiges des arbres. La PEPC des plantes C<sub>4</sub> présentent des caractéristiques biochimiques bien différentes de celle des plantes C<sub>3</sub>. Si un tel mécanisme photosynthétique de type C<sub>4</sub> a lieu dans la tige, la fixation de CO<sub>2</sub> (impliquant le PEPC) et la phase photochimique (impliquant la Rubisco) devraient être séparés dans l'espace.

**Est-ce que la PEPC des tiges d'arbres possède des caractéristiques biochimiques similaires à la PEPC des plantes en C<sub>4</sub> ? Quelle est la distribution spatiale de la PEPC et de la Rubisco dans la tige ?**

La fonction de photosynthèse est liée à de nombreux paramètres environnementaux. Par exemple, lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> ou la quantité de lumière augmentent, l'assimilation de carbone est stimulée. Il en est de même pour l'augmentation de l'apport en azote du sol. En effet, l'azote assimilé par la plante est en grande partie alloué aux protéines du cycle de Calvin-Benson-Bassham (notamment la Rubisco) et à la chlorophylle. De plus, le métabolisme azoté est intimement lié au métabolisme carboné car l'assimilation de l'azote nécessite beaucoup de squelettes carbonés provenant du cycle de Krebs ( $\alpha$  Ketoglutarate). C'est pourquoi la voie anaplérotique et l'activité PEPC sont stimulées afin de fournir davantage de carbone au cycle de Krebs.

**Est-ce qu'une augmentation de l'azote dans le sol peut stimuler la photosynthèse des tiges, comme ce qui est observé chez les feuilles ? Est-ce que la voie anaplérotique via la PEPC est également stimulée dans la tige ?**

Afin de répondre à ces questions et apporter des éléments nouveaux à la compréhension de la photosynthèse des tiges, nous avons réalisé plusieurs expérimentations qui ont fait l'objet de publications scientifiques (3 articles acceptés et un prochainement soumis). Les quatre chapitres qui suivent (II, III, IV & V) correspondent respectivement aux quatre points cités ci-dessus. Chaque chapitre débute par une présentation du travail, suivie des principaux résultats de l'étude ; il est agrémenté d'informations et/ou d'illustrations complémentaires à l'article correspondant.

Le chapitre VI est une discussion/conclusion générale reprenant les principaux points de la thèse ainsi que les perspectives envisagées.





## ***II) COMPARAISON INTERSPECIFIQUE DE LA PHOTOSYNTHESE DES TIGES***

---



## PRESENTATION

Comme précisé auparavant, nous présentons ici le contexte scientifique de l'étude et ses principaux résultats.

Il existe de nombreux travaux portant sur la comparaison de la photosynthèse des feuilles que ce soit au sein même d'une espèce ou entre différentes espèces. Dans la plupart des cas, les traits structuraux de la feuille sont corrélés aux traits fonctionnels, dont notamment ceux liés à la photosynthèse, fonction principale de la feuille. La masse surfacique foliaire (LMA, leaf mass per area) ainsi que la concentration en azote total sont d'importants traits qui sont associés aux variations de l'assimilation de carbone. Sur les vingt dernières années, les chercheurs se sont activement penchés sur la quantification des relations entre les différents traits foliaires et entre ces traits foliaires et le climat (Reich *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2004). D'autres ont profité des résultats de ces études pour modéliser les flux et les stocks de carbone et d'azote dans la plante.

A première vue, la tige ligneuse n'est pas spécialisée dans la fonction de photosynthèse mais nous avons vu dans le **chapitre I** qu'elle est pourtant capable de refixer une partie du carbone perdu par respiration. La photosynthèse des tiges a été étudiée chez des espèces d'arbres variées. Parmi elles, nous pouvons citer des espèces décidues comme le peuplier (plusieurs espèces, genre *Populus*), le bouleau (*Betula pendula* Roth.), le hêtre (*Fagus sylvatica* L.), le chêne (plusieurs espèces, genre *Quercus*) et le frêne (*Fraxinus excelsior* L.), et des espèces sempervirentes comme le pin blanc (*Pinus monticola*) et l'épicéa (*Picea abies* (L.) Karst.). Ces études se sont, pour la plupart, focalisées sur les jeunes tiges d'une ou deux espèces d'arbres et il n'en existe a priori aucune qui a examiné les relations entre les caractéristiques structurales de la tige et ses capacités photosynthétiques.

### Existe-t-il, chez la tige photosynthétique des relations entre traits structuraux et traits fonctionnels, comme chez les feuilles ?

Afin de répondre à cette question, nous avons examiné des traits fonctionnels photosynthétiques (échanges gazeux, fluorescence chlorophyllienne) et des traits structuraux (contenus en chlorophylle et en azote et masse surfacique des tiges) des tiges. Nous avons choisi de travailler sur neuf espèces d'arbres répartis sur le campus d'Orsay de l'Université Paris-Sud.

Elles comptaient :

- sept espèces décidues : le hêtre (*Fagus sylvatica* L.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.), le tilleul (*Tilia cordata* Mill.), le bouleau (*Betula pendula* Roth.), le frêne (*Fraxinus excelsior* L.) et l'aulne (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) ;
- deux espèces sempervirentes : l'épicéa (*Picea abies* (L.) Karst) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) ;
- une espèce, membre survivant, d'un groupe primitif de gymnospermes : le ginkgo (*Ginkgo biloba* L.).



**Figure 12** : chambre "conifer chamber" LI-6400-05 utilisée avec l'analyseur LI-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE) pour les mesures d'échanges gazeux des tiges. Ici, une tige de l'année d'épicéa (*Picea abies*) dépourvue de ses aiguilles.

Le choix de ces espèces avait également pour but de caractériser la photosynthèse des tiges en été et en hiver, lorsque certaines espèces sont exemptes de feuilles (espèces décidues) ou d'autres, au contraire, les possèdent toujours (espèces sempervirentes). Les échanges gazeux (**figure 12**), les contenus en chlorophylle et en azote ainsi que le rendement quantique maximal des PSII ( $F_v/F_m$ ) et la distribution de la chlorophylle dans la tige ont été examinés à deux périodes distinctes de l'année, été et hiver (**figure 13**).



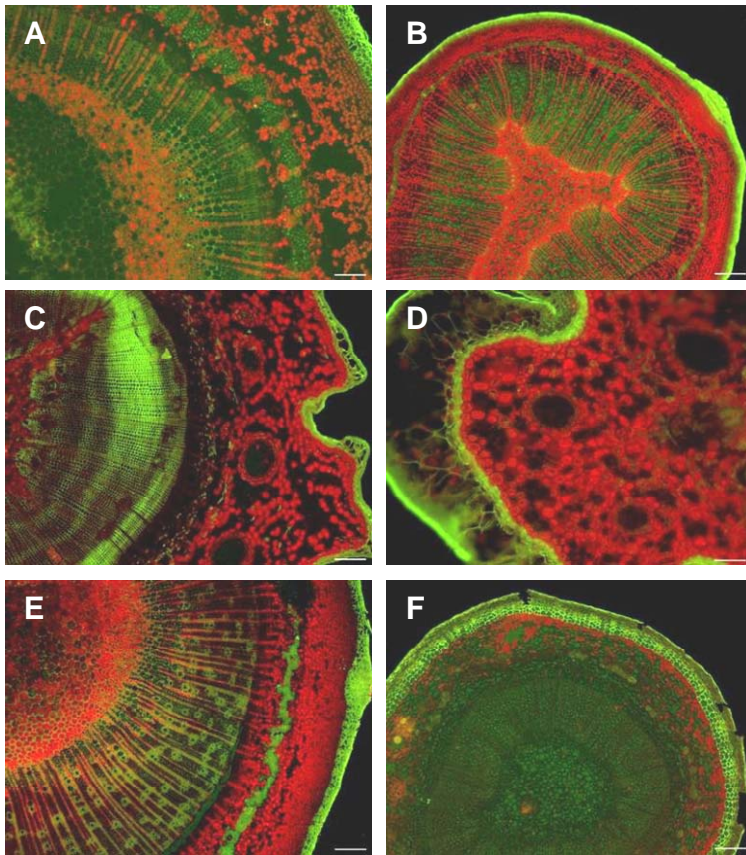
Figure 13 : tiges de l'année des neuf espèces d'arbres étudiées dans l'expérimentation de comparaison interspécifique de la photosynthèse des tiges. Pour la photographie, les tiges ont été dépourvues de leurs feuilles.

## PRINCIPAUX RESULTATS

Sur les tiges de l'année des neuf espèces d'arbres étudiées, la **présence de chlorophylle** a été observée et **une baisse d'efflux de CO<sub>2</sub> a toujours été mesurée lorsque la tige était transférée de l'obscurité à la lumière**. A l'heure actuelle, il n'y a pas d'étude indiquant l'absence de photosynthèse de tige, aussi bien pour les tiges d'espèces arborescentes que celles des espèces herbacées. Cette étude est l'une des toutes premières qui a fait appel à la microscopie à épifluorescence pour distinguer et localiser la chlorophylle dans les tiges.

En ce qui concerne les échanges gazeux, il a été calculé que 77 % du CO<sub>2</sub> respiré est refixé par la photosynthèse des tiges contre 34 % en hiver, en moyenne sur les neuf espèces étudiées. Les mesures de photosynthèse brute varient entre 0.7 et 4.0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en été et entre 0.6 et 2.7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en hiver. Lors du passage de l'été à l'hiver, les **modifications structurales des tiges** (augmentation de la masse surfacique, épaissement de l'écorce) **induisent une baisse du contenu en chlorophylle, une baisse de l'efficacité des photosystèmes II et, par conséquent, une baisse de la photosynthèse brute**. De plus, l'azote alloué à la photosynthèse diminue (baisse du PNUE, Photosynthesis Nitrogen Use Efficiency). Alors qu'**en été, les tiges des espèces étudiées présentent un  $F_v/F_m$  proche de 0.8 (valeur similaire aux feuilles matures)**, une variabilité interspécifique est observée en hiver. Cette variabilité est expliquée par les différences de structures des tiges entre les espèces qui protègent plus ou moins le système photosynthétique de la photoinhibition et du froid hivernal.

La distribution de la chlorophylle observée sur des sections de tige de l'année indique que la **chlorophylle est majoritairement distribuée en périphérie**, dans le chlorenchyme (**figure 14**). Malgré tout, pour certaines espèces dont l'aulne et le bouleau, la chlorophylle était également bien représentée dans le parenchyme médullaire.



**Figure 14** : exemples de coupes de tiges de l'année prélevées en hiver sur des espèces d'arbres du campus d'Orsay et observées en microscopie à épifluorescence. La chlorophylle fluoresce naturellement dans le rouge ce qui permet de la localiser aisément. A : *Fraxinus excelsior*, B : *Alnus glutinosa*, C : *Pinus sylvestris*, D : *Picea abies*, E : *Magnolia macrophylla*, F : *Ginkgo biloba*. Barres d'échelles = 100  $\mu\text{m}$  (A, D) et 200  $\mu\text{m}$  (B, C, E, F).

La variabilité observée sur les traits fonctionnels et structuraux nous a permis d'établir des relations entre la mesure des échanges gazeux et plusieurs traits structuraux. Nous montrons ainsi une **relation positive entre la photosynthèse brute maximale (PPFD saturant) et :**

- **la respiration à l'obscurité** (en été,  $r^2=0.94$ ;  $P < 0.01$ ). Alors que ce type de relation est tout à fait classique chez les feuilles (relation expliquée par l'utilisation des produits de la photosynthèse par la respiration), il n'était pas évident qu'on la retrouve chez la tige car les substrats de la respiration peuvent provenir (1) des photosynthétats foliaires, (2) des réserves, (3) des photosynthétats de la tige. Cette relation significative, en hiver comme en été, semble indiquer que les produits photosynthétiques de la tige sont respirés immédiatement.
- **le contenu en azote** (en été,  $r^2=0.59$ ;  $P < 0.01$ ). Cette relation, bien déterminée chez les feuilles, peut s'expliquer par le rôle central qu'occupe l'azote dans le cycle de Calvin-Benson-Bassham (**annexe 1**) et dans les thylakoïdes. Cette relation suggère également que la baisse de  $\text{CO}_2$  observée à la lumière est principalement due à l'augmentation de l'assimilation de  $\text{CO}_2$  plutôt qu'à une inhibition de la respiration à la lumière.
- **le contenu en chlorophylle** (en été,  $r^2=0.59$ ;  $P < 0.05$ ). Le processus d'assimilation de carbone par les tiges est dépendant de la lumière.

L'ensemble des résultats mettent en évidence une **grande variabilité dans les paramètres étudiés et montrent que les relations habituellement observées entre traits structuraux et traits fonctionnels chez les feuilles sont retrouvées chez les tiges de l'année.**



**ARTICLE :**

**INTERSPECIFIC VARIABILITY OF STEM PHOTOSYNTHESIS AMONG TREE SPECIES**

BERVEILLER Daniel, KIERZKOWSKI Daniel, DAMESIN Claire

*Tree Physiology*, **27**: 53-61

Janvier 2006





## Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species

DANIEL BERVEILLER,<sup>1,2</sup> DANIEL KIERZKOWSKI<sup>3</sup> and CLAIRE DAMESIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Écologie, Systématique et Évolution (ESE), CNRS & Université Paris Sud, Bât 362, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>2</sup> Corresponding author (daniel.berveiller@ese.u-psud.fr)

<sup>3</sup> Laboratory of General Botany, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89, 61-614 Poznan, Poland

Received November 25, 2005; accepted March 19, 2006; published online October 2, 2006

**Summary** The photosynthetic characteristics of current-year stems of six deciduous tree species, two evergreen tree species and ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) were compared. Gas exchange, chlorophyll concentration, nitrogen concentration and maximum quantum yield of PSII were measured in stems in summer and winter. A light-induced decrease in stem CO<sub>2</sub> efflux was observed in all species. The apparent gross photosynthetic rate in saturating light ranged from 0.72  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ginkgo, in winter) to 3.73  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., in summer). Despite this variability, a unique correlation (slope = 0.75), based on our results and those reported in the literature, was found between gross photosynthetic rate and dark respiration rate. Mass-based gross photosynthetic rate decreased with stem mass per area and correlated to chlorophyll concentration and nitrogen concentration, both in summer and winter. The radial distribution of stem chlorophyll differed among species, but all species except ginkgo had chlorophyll as deep as the pith. In summer, the maximum quantum yield of stem PSII (estimated from the ratio of variable to maximal fluorescence;  $F_v/F_m$ ) of all species was near the optimal value found for leaves. By contrast, the values were highly variable in winter, suggesting large differences in sensitivity to low-temperature photoinhibition. The winter values of  $F_v/F_m$  were only 31–60% of summer values for the deciduous species, whereas the evergreen conifer species maintained high  $F_v/F_m$  in winter. The results highlight the interspecific variability of gross photosynthesis in the stem and its correlation with structural traits like those found for leaves. The structural correlations suggest that the selection of photosynthetic traits has operated under similar constraints in stems and leaves.

**Keywords:** chlorophyll,  $F_v/F_m$ , nitrogen, stem gas exchange.

### Introduction

In contrast with leaves, stems are not obviously specialized for photosynthesis. Their surface to volume ratio is low, as is transmittance to light through the bark layer (Pfanz et al. 2002). Nevertheless, these conditions, although a priori unfavorable, do not prevent chlorophyll synthesis and carbon assimilation in stems. Kharouk et al. (1995) calculated that 45%

of total tree chlorophyll is present in the twig and branch chlorophyll of aspen. Compared with leaves, stems have some photosynthetic advantages. For example, the measured CO<sub>2</sub> concentration in stems is high enough (up to 260,000 ppm) to inhibit photorespiration, increasing quantum yield. The lack of stomata inhibits transpiration, increasing water-use efficiency over that of leaves.

Stem photosynthesis has been studied in legume species, such as broom (Nilsen et al. 1993, 1996), and in various tree species (see review by Pfanz et al. 2002). Compared with the maximal net photosynthetic rate of leaves, which may reach up to 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in temperate trees, e.g., some species of the genus *Quercus*, the photosynthetic rate of stems is much lower (Cernusak and Marshall 2000, Aschan et al. 2001, Wittmann et al. 2001). For this reason, gross photosynthesis is usually calculated to characterize the stem photosynthesis. Gas-exchange measurements of stems are generally achieved instantaneously, over short periods, and most studies provide only a snap-shot in time. Studies in which gas exchange was monitored during an entire season, however, have revealed that gross stem photosynthesis may be higher than the dark respiration rate, particularly during the stem growth period (April to September) and in winter (Foote and Schaedle 1976, Damesin 2003). A current-year stem of beech can potentially assimilate 0.13 g of carbon during the growth period, corresponding to 68% of the total carbon assimilated over one year (Damesin 2003).

Leaf gas exchange has often been related to leaf structural traits, both within and among species (Reich et al. 1997). Leaf mass per area (LMA) and nitrogen concentration are important leaf traits that are associated with variations in carbon assimilation. Expressed in mass-based units, the light-saturated assimilation of leaves is negatively correlated to LMA (Wright et al. 2004). Leaf photosynthetic capacities are positively correlated to leaf nitrogen concentration because proteins of the Calvin-Benson cycle and of thylakoids represent the major part of leaf nitrogen (Evans 1989). This relationship has also been observed for stem photosynthesis of the legume species *Spartium junceum* L. and *Cytisus scoparius* L. (Nilsen 1992, Nilsen and Karpa 1994) and of the tree species *Pinus monticola* Dougl. ex D. Don (Cernusak and Marshall 2000). To our knowledge, the relationship has never been compared

directly among tree species, and interspecific comparisons based on published data are difficult because of the variety of methods used.

In this study, we compared nine adult temperate tree species growing on the campus of the University of Paris XI: six deciduous species (European beech (*Fagus sylvatica* L.), common oak (*Quercus robur* L.), small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.), silver birch (*Betula pendula* Roth.), ash (*Fraxinus excelsior* L.) and alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)); two evergreen species (Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)); and ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), a surviving member of a primitive group of gymnosperms. The experiment was carried out on current-year stems during winter and summer. Gas exchange, chlorophyll and nitrogen concentrations, maximum quantum yield of PSII and location of chlorophyll were examined. Our main objectives were: (1) to characterize the physiological variation in stem photosynthesis among species and between studied seasons; (2) to investigate the relationships between functional (gas exchange, fluorescence parameters) and structural (chlorophyll, nitrogen, stem mass per area) traits and compare these relationships to those commonly observed in leaves. Because the stem is not specialized for photosynthesis, we predicted minimum nitrogen and chlorophyll investment for all species.

## Materials and methods

### Site description and plant materials

The experiment was conducted in 2004 on nine tree species grown in a temperate climate on the campus of the University of Paris XI (48°42' N, 02°10' E), 25 km south-west of Paris, France (elevation: 65 m). The studied species, European beech, common oak, small-leaved linden tree, silver birch, ash, alder, Norway spruce and Scots pine are commonly observed in European temperate forests or parks. *Ginkgo biloba* was chosen because it is recognized as a "living fossil" that possesses primitive characters. In the gymnosperm phylogeny, it is the unique representative of the Ginkgoales branch. The trees were located on the same type of soil (brown soil in the process of formation on top of colluviums), and were of similar height (15–20 m) and age (35–50 years).

Current-year stems of three trees per species were sampled at the end of June (summer period) and at the end of March (winter period). During the measurement periods, mean diurnal temperatures were, on average, 16.3 °C at the end of June and 7.6 °C at the end of March. For each tree, all parameters were measured in the midsection of 2–3 current-year stems, the diameter of which varied between 2 mm (*Betula pendula*) and 5 mm (*Pinus sylvestris*). We sampled sun-exposed stems from the outer crown at a height of about 2–4 m with a pruning hook. Samples were harvested around 1400 h UT for gas exchange; samples for chlorophyll extraction were immediately immersed in liquid nitrogen and stored at –80 °C until assayed.

### Gas-exchange measurements

Gas exchange was measured in the laboratory on detached stems with an LI-6400 portable photosynthesis system (Li-Cor, Lincoln, NE) and a conifer chamber (Li-Cor Model 6400-05) similar to the one described by Damesin (2003). In this chamber, temperature and CO<sub>2</sub> are controlled by the LI-6400 portable photosynthesis system. Each stem sample was immediately recut under distilled water in the section of tissue produced the previous year. A part of the current-year stem was immediately placed in the chamber and the cut end kept submerged in water during measurements. Sometimes it was necessary to remove a leaf (or most of the needles for *P. abies* and *P. sylvestris*) on the current-year stem when the internode was not long enough to fill the chamber. Because of the leaf and needle scars and the high CO<sub>2</sub> concentration in the stem, "wound respiration" might have occurred but was not taken into account because, for each species, the difference in CO<sub>2</sub> efflux between an intact stem and a stem from which a leaf had been removed was negligible.

Measurements were made at 20 °C, a CO<sub>2</sub> concentration of 390 ppm, 60% relative humidity and 1400 or 0 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of photosynthetically active radiation (PAR) to determine CO<sub>2</sub> efflux rates in the light ( $R_l$ ) and in the dark, i.e., dark respiration rate ( $R_d$ ). A mercury light source (2 × 1000 W HQI, OSRAM, Munich, Germany) was placed 1 m above the chamber. Also, a small laboratory-made gallium arsenide phosphide PAR sensor, calibrated with the Li-Cor PAR sensor located in a leaf chamber, was installed in the 6400-05 chamber close to the sample. Under both light conditions, samples were acclimated for 15–20 min before measurements were made. Efflux of CO<sub>2</sub> was measured five to 10 times at 30-s intervals. The system was checked for leaks by blowing around the chamber for each measured sample. To express CO<sub>2</sub> efflux in terms of mass and area units, stem areas were measured and the tissues were dried at 60 °C for 48 h. A relationship between the observed decrease in CO<sub>2</sub> efflux from stem tissue in the light has been linked to photosynthesis by <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> labeling studies (Langenfeld-Heyser 1989) and by experiments with a Clark-type O<sub>2</sub> electrode (Pfanz and Aschan 2001) and possibly also to light inhibition of respiration (this was shown in leaves (Atkin et al. 2000) but has never been investigated in stems); however, we were unable to distinguish between these effects. In our study, the value obtained by subtracting  $R_d$  from  $R_l$  is referred to as the apparent gross photosynthetic rate ( $P_g$ ).

### Nitrogen concentration

Dry mass (DW) of each sample used for gas-exchange measurements was determined. Subsequently, the samples were cut into small pieces and ground to a powder (MM200, RETSCH, Haan, Germany). The nitrogen concentration of the powder was determined with an elemental analyzer at the "Service Central d'Analyse du CNRS" (Vernaison, France).

### Chlorophyll concentration

The proximal half of the second internode of the stem was sampled. Each stem sample was cut finely with a pair of pruning shears, and placed in a tube with 4 ml of *N,N*-dimethyl-

formamide (DMF). The tubes were incubated for 2 h in darkness at 65 °C with stirring (Reacti-Therm III, PIERCE, Rockford, USA), followed by a 1-h incubation at room temperature. Without centrifugation, the absorbance of the clear supernatant was measured at 663.6 nm and 646.6 nm with a spectrophotometer (Lambda 18, PERKIN ELMER, Shelton, USA). The amounts of chlorophyll a and b were calculated as described by Porra et al. (1986). The part of the stem that was not used for chlorophyll determination was dried at 60 °C for 48 h to determine the corresponding DW.

#### Chlorophyll localization in stems

Chlorophyll localization was visualized by epifluorescence microscopy (ZEISS, Rödermark, Germany). The microscope was equipped with a blue excitation filter (BP 450–490) and an emission filter (LT 520) and linked to a computer. Images were acquired with an Insight camera, and image contrast was enhanced using diagnostic imaging advanced SPOT software (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI). Chlorophyllous cells were identified by their bright red fluorescence, which is characteristic of chlorophyll. A qualitative analysis of chlorophyll distribution was made from three stem sections of each species.

#### Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll fluorescence was measured in situ on attached and intact stems with a portable pulse-modulated fluorometer (PAM-2000, WALZ, Effeltrich, Germany). The maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) was determined as the ratio of variable to maximal fluorescence: i.e.,  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ , where  $F_0$  and  $F_m$  are initial and maximal fluorescence of dark-adapted stems, respectively. We determined  $F_0$  with a modulated measuring light from a light-emitting diode ( $< 0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 655 nm) at a frequency of 600 Hz. Maximal fluorescence ( $F_m$ ) was obtained following a brief saturation light pulse (0.8 s,  $> 5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Measurements were conducted before sunrise (i.e., after complete relaxation of PSII during the night) under ambient conditions with two to three recordings along the upper surface of the stem. In winter, the  $F_v/F_m$  measurements were obtained at low temperature (about 6 °C) but they could be related to the gas exchange measured at 20 °C because the  $F_v/F_m$  values obtained under field conditions remain stable for several days under laboratory conditions (Larcher and Nagele 1992).

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with “Statistica” software (STATSOFT, Tulsa, USA). Effects of species, season and species  $\times$  season on  $\text{CO}_2$  efflux in light,  $\text{CO}_2$  efflux in darkness, total chlorophyll concentration (chl a + b), chlorophyll a:b ratio (chl a:b), nitrogen concentration (see Table 2) and the fluorescence parameters ( $F_v/F_m$ ,  $F_0$ , and  $F_m$ ) were evaluated by analysis of variance (ANOVA). Interspecific and interseasonal variability of  $F_0$ ,  $F_m$ , and  $F_v/F_m$  measured on dark-adapted stems were tested by the Student’s *t* test.

## Results

### Interspecific and seasonal variability in gas exchange and structural traits

Mean values of  $R_i$ ,  $R_d$ , chl a + b, chl a:b and nitrogen concentration for each species for the summer and winter seasons are shown in Table 1. Species, season and species  $\times$  season effects were tested. A highly significant species effect ( $P < 0.001$ ) was found for all of the studied parameters. For each species,  $R_i$  was higher than  $R_d$ . In summer, refixation rates, calculated as  $(R_d - R_i)/R_d$ , ranged from 67% (*Ginkgo biloba*, *Tilia cordata*) to 81% (*Alnus glutinosa*) and averaged  $71 \pm 4.8\%$  across all species. The refixation rate decreased in winter for *Ginkgo biloba*, *Picea abies* and *Pinus sylvestris* (refixation rate =  $54 \pm 3.8\%$  on average) and increased for *Alnus glutinosa*, *Betula pendula*, *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* (refixation rate =  $121 \pm 5.3\%$  on average). Hence, during winter, the latter four species had a positive  $\text{CO}_2$  efflux in light ( $R_i > 0$ ).

Gas-exchange characteristics ( $R_d$  and  $R_i$ ) varied significantly between seasons. Total chlorophyll concentration decreased from summer to winter except in *Pinus sylvestris*. By contrast, there was no significant difference in nitrogen concentration between seasons. Chlorophyll and nitrogen concentrations were positively correlated in summer ( $r^2 = 0.76$ ,  $P = 0.0022$ ,  $n = 9$ , relationship not shown) but not in winter ( $P = 0.3847$ ). Among species, the chlorophyll a:b ratio varied between 1.4 and 3.3 in summer and between 1.8 and 3.6 in winter.

### Relationship between photosynthetic and respiration rates

In summer ( $P < 0.0001$ ) and winter ( $P = 0.0033$ ), there was a significant relationship between apparent area-based gross photosynthetic rate ( $P_g$ ) measured at  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PAR and area-based dark respiration rate ( $R_d$ ) (Figure 1A). The correlation was also significant when expressed on a mass basis ( $r^2 = 0.97$ ,  $P < 0.0001$  for summer and  $r^2 = 0.37$ ,  $P = 0.0020$  for winter, data not shown). We compared our results per species and per season with published data (Figure 1B), in which the same and other tree species were studied. A combination of all the data yielded a unique correlation, with a slope of 0.75, i.e., an estimated mean refixation rate of 75%. Published refixation rates calculated for current-year stems ranged between 31 and 90% for woody species (see Pfanz et al. 2002 for a detailed table of maximum stem  $\text{CO}_2$  refixation rates).

### Relationships between functional and structural traits

Expressed in mass-based units,  $P_g$  ranged from 1.6 to  $19.5 \mu\text{mol (kg DW)}^{-1} \text{s}^{-1}$  in summer and from 0.93 to  $6.14 \mu\text{mol (kg DW)}^{-1} \text{s}^{-1}$  in winter; stem mass per area was, on average, higher in winter than in summer (Figure 2). When all data from both seasons were included, a significant exponential relationship ( $P < 0.0001$ ) between  $P_g$  ( $\mu\text{mol (kg DW)}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) and stem mass per area ( $\text{g DW m}^{-2}$ ) was found.

In both seasons, there was a significant relationship between  $P_g$  and N concentration ( $P < 0.0001$  in summer and  $P = 0.0002$  in winter), with a higher slope in summer (Figure 3). The

Table 1. The CO<sub>2</sub> efflux rate in the light ( $R_l$ ) and in the dark ( $R_d$ ), total chlorophyll concentration (Chl a + b), chlorophyll a:b ratio (Chl a:b) and total nitrogen concentration (N) of current-year stems of the studied tree species in summer and winter. Data are means  $\pm$  SE with  $n = 3$ . The  $F$  values are given for the effect of species, season and the interaction between them. Significance was as follows: ns, not significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Season	Species	$R_l$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Chl a + b ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Chl. a:b	N ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Summer	<i>Alnus glutinosa</i>	$-0.89 \pm 0.05$	$-4.62 \pm 0.26$	$0.96 \pm 0.03$	$2.61 \pm 0.06$	$14.68 \pm 0.97$
	<i>Betula pendula</i>	$-0.69 \pm 0.11$	$-3.04 \pm 0.53$	$0.66 \pm 0.07$	$2.39 \pm 0.12$	$13.00 \pm 1.68$
	<i>Fagus sylvatica</i>	$-0.66 \pm 0.10$	$-2.15 \pm 0.25$	$0.47 \pm 0.02$	$2.34 \pm 0.06$	$7.38 \pm 0.47$
	<i>Fraxinus excelsior</i>	$-0.38 \pm 0.13$	$-1.44 \pm 0.34$	$0.46 \pm 0.02$	$3.03 \pm 0.01$	$7.90 \pm 0.62$
	<i>Ginkgo biloba</i>	$-0.54 \pm 0.10$	$-1.65 \pm 0.16$	$0.64 \pm 0.05$	$2.93 \pm 0.04$	$10.53 \pm 0.31$
	<i>Picea abies</i>	$-1.12 \pm 0.10$	$-3.44 \pm 0.34$	$0.43 \pm 0.04$	$3.21 \pm 0.05$	$9.43 \pm 0.49$
	<i>Pinus sylvestris</i>	$-1.16 \pm 0.12$	$-4.04 \pm 0.53$	$0.53 \pm 0.07$	$3.33 \pm 0.12$	$10.98 \pm 2.20$
	<i>Quercus robur</i>	$-1.18 \pm 0.37$	$-3.75 \pm 0.64$	$0.66 \pm 0.03$	$1.43 \pm 0.29$	$10.47 \pm 0.37$
	<i>Tilia cordata</i>	$-0.68 \pm 0.10$	$-2.10 \pm 0.19$	$0.59 \pm 0.09$	$2.25 \pm 0.06$	$10.70 \pm 0.51$
Winter	<i>Alnus glutinosa</i>	$0.35 \pm 0.11$	$-1.57 \pm 0.44$	$0.60 \pm 0.00$	$2.24 \pm 0.03$	$13.18 \pm 0.33$
	<i>Betula pendula</i>	$0.47 \pm 0.03$	$-2.06 \pm 0.15$	$0.44 \pm 0.31$	$3.64 \pm 0.00$	$16.20 \pm 0.35$
	<i>Fagus sylvatica</i>	$0.19 \pm 0.14$	$-1.40 \pm 0.24$	$0.31 \pm 0.01$	$2.49 \pm 0.16$	$9.22 \pm 0.51$
	<i>Fraxinus excelsior</i>	$0.22 \pm 0.01$	$-0.86 \pm 0.24$	$0.29 \pm 0.01$	$3.50 \pm 0.16$	$6.90 \pm 0.35$
	<i>Ginkgo biloba</i>	$-0.53 \pm 0.43$	$-1.24 \pm 0.40$	$0.22 \pm 0.02$	$2.55 \pm 0.07$	$9.27 \pm 0.77$
	<i>Picea abies</i>	$-1.09 \pm 0.55$	$-2.18 \pm 0.46$	$0.34 \pm 0.03$	$2.65 \pm 0.09$	$9.37 \pm 1.66$
	<i>Pinus sylvestris</i>	$-1.91 \pm 0.33$	$-4.22 \pm 0.15$	$0.56 \pm 0.02$	$3.27 \pm 0.02$	$8.85 \pm 0.68$
	<i>Quercus robur</i>	$-0.81 \pm 0.33$	$-2.87 \pm 0.34$	$0.43 \pm 0.06$	$1.83 \pm 0.65$	$10.47 \pm 0.12$
	<i>Tilia cordata</i>	$-0.51 \pm 0.05$	$-2.06 \pm 0.20$	$0.34 \pm 0.24$	$2.78 \pm 0.38$	$15.15 \pm 0.65$
	<b>Species</b>	8.01***	13.47***	13.68***	36.17***	11.74***
	<b>Season</b>	11.45**	23.39***	91.96***	7.27*	0.69 ns
	<b>Species <math>\times</math> Season</b>	3.10*	2.88 *	4.42**	10.01***	2.48*
	<b>df error</b>	32	32	32	32	32

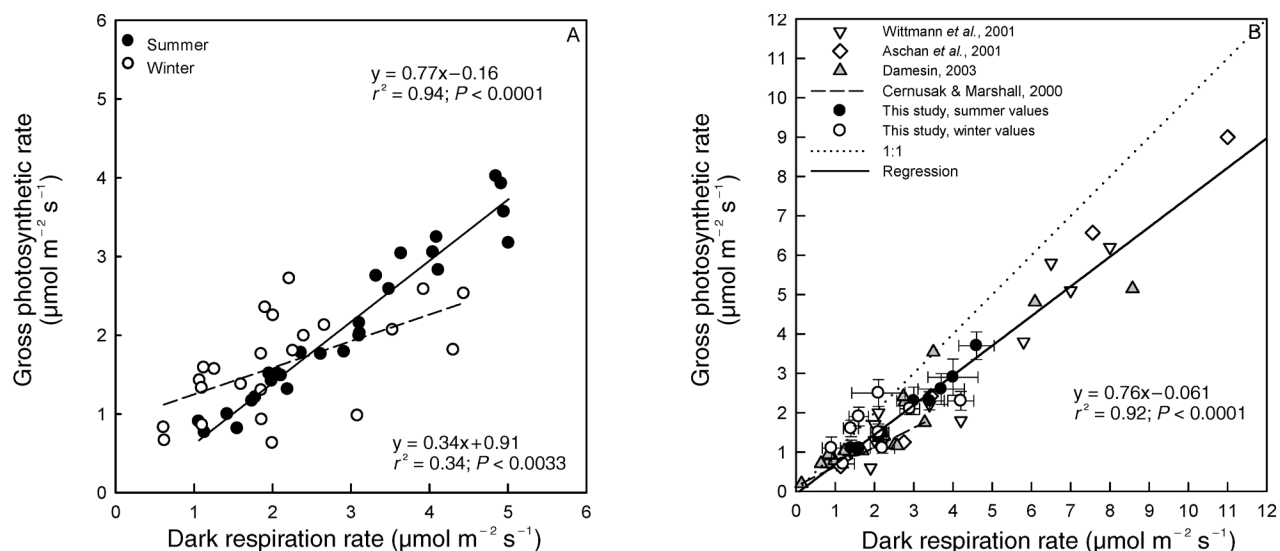


Figure 1. Relationships between area-based gross photosynthetic rate ( $P_g$ ) and area-based dark respiration rate ( $R_d$ ) for our data (A) and our data plus published data (B). All  $R_d$  values are presented in absolute units. In A, each value corresponds to the mean  $P_g$  and  $R_d$  for each individual. In B, our data are represented by the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) for each species. Data from the literature correspond: (1) to the mean of 10 values obtained from measurements on current-year stems of *F. sylvatica* and *P. tremula* exposed to two light regimes (Wittmann et al. 2001) and for different internodes (Aschan et al. 2001); (2) to the means of three values obtained from measurements on current-year stems of *F. sylvatica* during the season (Damesin 2003); and (3) to the relationship obtained from branches of young and mature *Pinus monticola* trees combined (Cernusak and Marshall 2000). For all these data,  $P_g$  was measured between 1000 and 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; gas exchange measurements were made between 20 and 25 °C and between 60 and 75% relative humidity. The regression obtained by Cernusak and Marshall (2000) was not taken into account in the calculation of the regression.



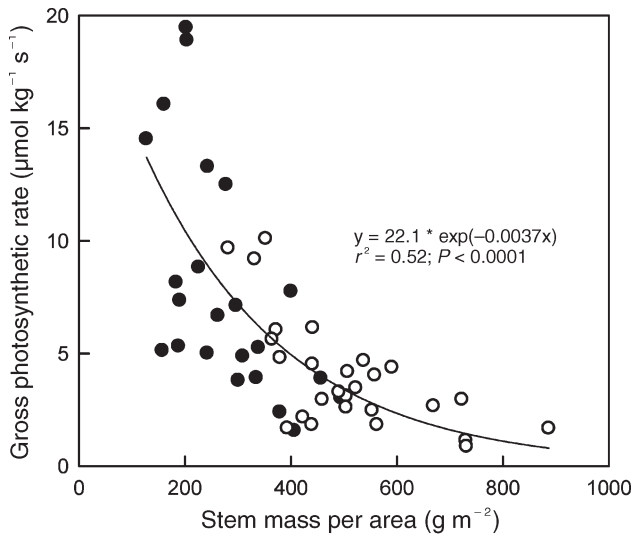


Figure 2. Relationships between mass-based gross photosynthetic rate and stem mass per area in sun-exposed current-year stems sampled in summer (●) and winter (○). Each value corresponds to the mean  $P_g$  for each individual.

slopes of the relationships corresponded to the photosynthesis nitrogen-use efficiency (PNUE), which on average equaled  $10.5 \pm 4.6 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mol N})^{-1} \text{s}^{-1}$  in summer and  $4.37 \pm 1.5 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mol N})^{-1} \text{s}^{-1}$  in winter. A significant and positive relationship between  $R_d$  and N concentration was obtained in summer ( $P < 0.0001$ ) but not in winter ( $P = 0.48$ ) (data not shown).

Figure 4 shows the means and standard errors of chlorophyll concentration and  $P_g$  for each species—the gas-exchange measurements and chlorophyll concentration estimations

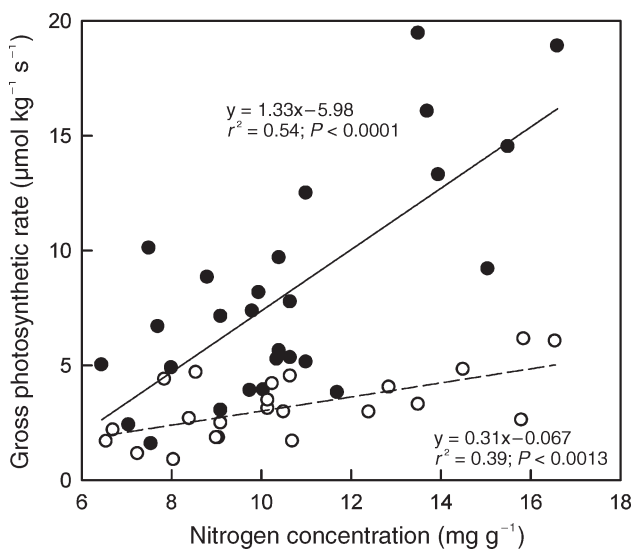


Figure 3. Relationships between mass-based gross photosynthetic rate and mass-based nitrogen concentration in sun-exposed current-year stems sampled in summer (●) and winter (○). Each value corresponds to the mean  $P_g$  for each individual.

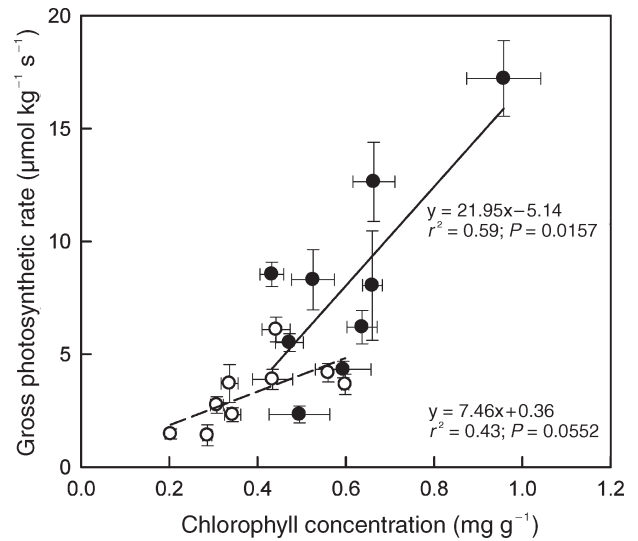


Figure 4. Relationships between mass-based gross photosynthetic rate and mass-based chlorophyll concentration in sun-exposed current-year stems sampled in summer (●) and winter (○). Mean values of each species are given, with  $n = 3$ . The standard errors of the ordinate and abscissa values are shown as vertical and horizontal bars, respectively.

were made on different current-year stems. There was a positive relationship between chlorophyll concentration and  $P_g$  in summer ( $P = 0.0157$ ) and in winter ( $P = 0.0552$ ). We also found a positive relationship between nitrogen concentration and total chlorophyll concentration that was significant in summer ( $r^2 = 0.76$ ;  $P = 0.0022$ ) but not in winter ( $r^2 = 0.11$ ;  $P = 0.3847$ ).

Table 2. Radial patterns of chlorophyll distribution in cross sections of current-year stems of several tree species in the winter. Black dots indicate the location of chlorophyll. Pattern 1 has high chlorophyll concentrations in the bark, cortical parenchyma and phloem. Pattern 2 has high concentrations in the xylem and the medullary rays (gray), plus interfascicular parenchyma, if any (designated by \*). Pattern 3 has high chlorophyll concentrations in the pith. The symbols qualitatively describe the percentage of the cross-sectional area in which chlorophyll is present: ~ 0, < 5%; +, 1–24%; ++, 25–49%; and +++ 50 to < 90%.

	1	2	3
<i>Alnus glutinosa</i>	+++	+	+++
<i>Betula pendula</i>	+++	+	+++
<i>Fagus sylvatica</i>	++	++*	++
<i>Fraxinus excelsior</i>	++	+	++
<i>Ginkgo biloba</i>	+	~ 0	~ 0
<i>Picea abies</i>	++	+	+
<i>Pinus sylvestris</i>	++	+	+
<i>Quercus robur</i>	++	+	++
<i>Tilia cordata</i>	~ 0	+	+

### Chlorophyll distribution

All stems had chlorophyllous cells, but the chlorophyll distribution varied among species (Table 2). Generally, the majority of chlorophyll was present in the cortical layers (Pattern 1); however, in some species, such as *A. glutinosa* (Figure 5A) and *B. pendula*, a large amount of chlorophyll was detected in the pith of the stem (+++, Pattern 3). In Pattern 2, the presence of chlorophyll in the considered area corresponded to the presence of medullary rays (the only living tissues in this area). The exception was *Fagus sylvatica*, which also possessed interfascicular parenchyma; hence the more important presence of chlorophyll in this area (++). In *Ginkgo biloba*, chlorophyll was detected only in the cortical layers (Figure 5B) and in *Tilia cordata* only near the center of the branch.

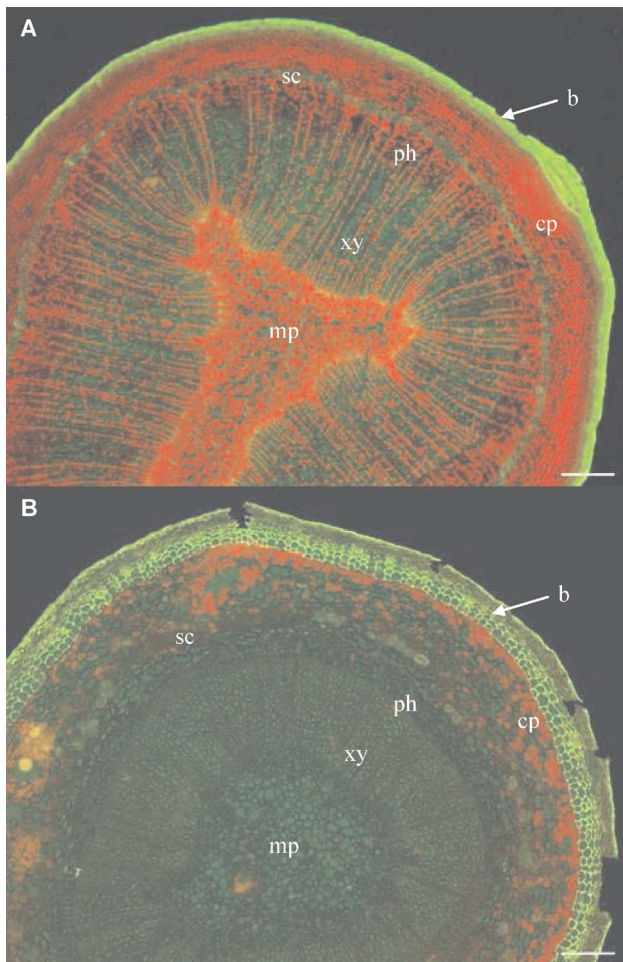


Figure 5. Sections of current-year stems of *Alnus glutinosa* (A) and *Ginkgo biloba* (B) observed by epifluorescence microscopy. Red fluorescence corresponds to the natural chlorophyll fluorescence when excited by blue photons. Abbreviations: b, outer and inner bark; cp, cortical parenchyma; mp, medullary parenchyma; ph, phloem vessels; sc, sclerenchyma; and xy, xylem vessels. Bar = 200  $\mu\text{m}$ .

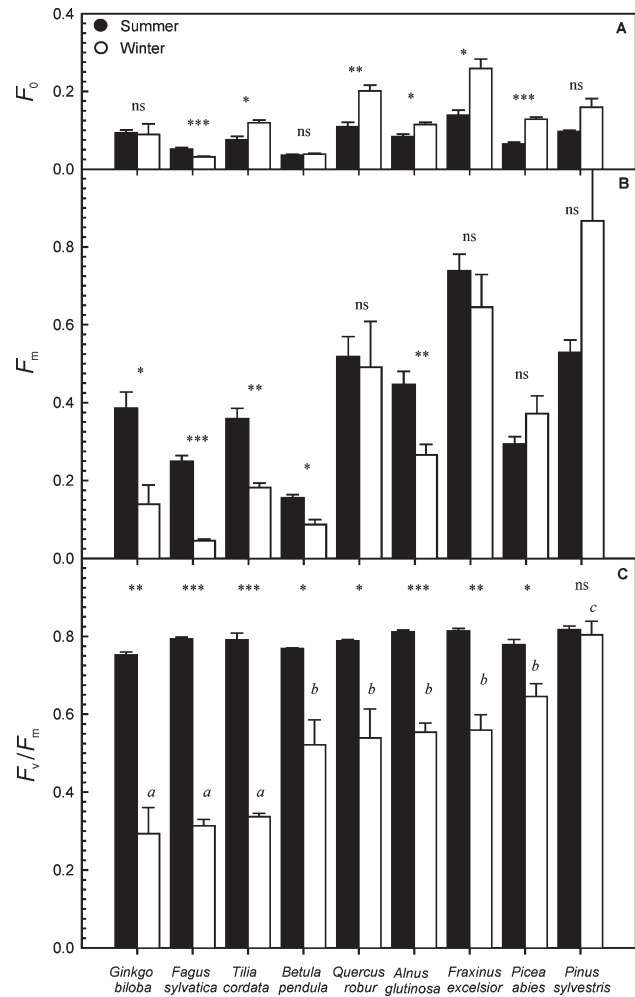


Figure 6. Interspecific and seasonal variability in  $F_0$  (A),  $F_m$  (B), and  $F_v/F_m$  (C) measured on dark-adapted stems in summer and winter. Data are the mean  $\pm$  SE, with  $n = 3$ . Significance between winter and summer for each species is as follows: ns, not significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*\*\*,  $P < 0.001$ . In C, different italic letters indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ) between species in winter.

### Effect of cold period on fluorescence parameters

The  $F_0$  values ranged from 0.031 for *Fagus sylvatica* to 0.233 for *Fraxinus excelsior*, both in winter (Figure 6A). On the whole,  $F_0$  was significantly higher in winter than in summer ( $P = 0.0069$ ). Values of  $F_m$  were highly variable among species both in summer and in winter (Figure 6B), and tended to decrease for all species, except *Picea abies* and *Pinus sylvestris*, from summer to winter. Nevertheless, there was no significant difference in  $F_m$  values between seasons ( $P = 0.36$ ).

The  $F_v/F_m$  of current-year stems of all species was high in summer (Figure 6C), ranging from 0.752 for *Ginkgo biloba* to 0.817 for *Pinus sylvestris*. During this period, no significant difference was observed between species. However, there was a significant decrease in  $F_v/F_m$  from summer to winter, except for *Pinus sylvestris*. The largest decrease (60%) was observed for *Ginkgo biloba*, *Fagus sylvatica* and *Tilia cordata* ( $F_v/F_m = 0.31 \pm 0.02$  in winter for these three species).

## Discussion

Current-year stems of all studied species showed apparent carbon assimilation in summer and winter. Our measured stem assimilation rates were similar to those previously reported for several tree species (Foote and Schaedle 1976, Schmidt et al. 2000, Wittmann et al. 2001, Pilarski 2002). The variability in stem assimilation rates among species was lower than that measured in leaves, with the values for stems being closer to those obtained for long-lived, thick dense leaves (or needles). A relationship between gross photosynthetic rate and dark respiration rate has been reported within species, including *Pinus monticola* (Cernusak and Marshall 2000) and *Fagus sylvatica* (Damesin 2003), but has never been shown among species. The relationship we observed was highly significant and the same slope was maintained when values from the literature were added (Figure 2B). Although measurements were made under optimum conditions, this result suggests that the relationship between gross photosynthetic rate and dark respiration rate is robust and independent of the conditions under which the tree is growing or the location of twigs within the crown. As a consequence, at least for young stems, dark respiration may be a good indicator of potential photosynthesis.

The correlation between apparent gross photosynthetic rate and nitrogen concentration suggests that the decrease in CO<sub>2</sub> efflux in light is mainly due to increased assimilation rather than to reduced respiration. A relationship between photosynthetic capacity and nitrogen concentration among species has been widely documented for leaves (e.g., Field and Mooney 1986, Reich et al. 1997). Our study showed that this relationship exists also for stems and that, as in leaves, it can be explained by the central role of nitrogen in the enzymes of the Calvin-Benson cycle and in thylakoid constituents. The relationship between nitrogen concentration and chlorophyll concentration in stems in summer showed that nitrogen investment in light harvesting is similar among species and about one tenth (0.47 mmol chlorophyll (mol N)<sup>-1</sup>) that in leaves (cf. Evans 1989).

From an ecophysiological viewpoint, the current-year stem could be considered a particular type of photosynthetic tissue with extreme “leaf” characteristics, i.e., low nitrogen concentration, high “leaf” mass per area and low assimilation rate. The similarity among functional and structural traits between stems and leaves could be the result of convergence in trait correlations among photosynthetic tissues. These trait correlations are likely to undergo adaptative evolution (see Ackerly et al. 2000, Arntz and Delph 2001, Reich et al. 2003). Some of these trait correlations, such as the relationship between assimilation and nitrogen, are linked by physiological mechanisms. The existence of this relationship in stems suggests that assimilation is not merely a basic function and that high nitrogen stem concentration reflects a higher investment in photosynthetic enzymes. We hypothesized that the coordination among traits observed in stems is the result of an ancestral selection that operated when stems were the major carbon assimilation tissue. Further investigations (i.e., comparative approach using phylogenetic trees) will increase our under-

standing of the evolution of stem photosynthetic characteristics.

The decrease in gross photosynthesis between summer and winter may be explained by a decrease in both total chlorophyll concentration and the efficiency of PSII (decreased  $F_v/F_m$ ), because nitrogen concentration did not undergo a seasonal change (Table 2). Changes in stem anatomy (bark thickness, cell-wall lignification) during growth lead to increased light interception in winter, which could explain the decrease in chlorophyll concentration. These anatomical changes also lead to a greater stem mass per unit area and to a lower PNUE in winter, indicating that, as for leaves (Poorter and Evans 1998, Ripullone et al. 2003), the fraction of nitrogen invested in the photosynthetic apparatus decreases with increasing tissue mass per area. The allocation of nitrogen to assimilation depends on the season, with interspecific variability in winter. We suggest that the studied species alter nitrogen partitioning within the photosynthetic apparatus, because the nitrogen–chlorophyll relationship disappeared in winter. As found for the leaves of some evergreen species (Hikosaka 2004), current-year stems probably have more proteins, both in their cell walls and in secondary compounds, in winter than in summer, leading to a smaller allocation of nitrogen to the photosynthetic apparatus. Nitrogen could also be stored in vegetative storage proteins, which represent the major form of storage in the vegetative tissues of perennial plants (Staswick 1994, Rowland and Arora 1997, Gomez and Faurobert 2002).

The presence of chlorophyll deep inside the stem suggests that, contrary to what is commonly assumed, both external and internal stem layers are able to photosynthesize, as has been demonstrated in a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> labeling experiment (Langenfeld-Heyser 1989). Our study species exhibited different patterns of chlorophyll distribution, which may mirror variability in light transmission through the peripheral layers. For example, a study by Pfanz and Aschan (2001) demonstrated that light transmission in small-leaved linden trees (*Tilia cordata*) and alder trees (*Alnus glutinosa*) differs (8 versus 24%, respectively). These results are consistent with our observations of low and high concentrations of chlorophyll for *T. cordata* and *A. glutinosa*, respectively. The location of chlorophyllous cells in the center of the pith is surprising, because one would expect little light to reach the pith (0.1–0.4%, Pfanz et al. 2002). However, it is possible that the optical properties of vascular tissue allow light conduction to the pith cells (Sun et al. 2003). Furthermore, the location of chlorophyllous cells surrounding xylem vessels could corroborate the suggestion that these cells play a part in stem carbon assimilation by using carbon dioxide dissolved in the sap stream, as shown in herbaceous species by Hibberd and Quick (2002).

In summer, current-year stems of all studied species exhibited nearly optimal  $F_v/F_m$  values of around 0.83, similar to the value measured for mature leaves of most plants (Björkman and Demmig 1987). A decrease in  $F_v/F_m$  in winter, which we observed for most of the species in our study, was also measured in *Fagus sylvatica* (Damesin 2003). The decrease in  $F_v/F_m$  could be caused by an increase in  $F_0$ , indicating damage to the PSII reaction-center complex, or by a decrease in the



size of the PSII chlorophyll antenna (Krause and Weis 1991), or both. Reactivation of photosynthesis in response to rewarming treatments indicates that this decrease is reversible after several days and is almost certainly caused by thermal injury of PSII (Larcher and Nagele 1992). Our results show that the sensitivity of the stem photosynthetic apparatus of the studied species differs during exposure to a harsh winter. Among species, the two evergreen species retained the highest  $F_v/F_m$  in winter, perhaps because the stems of the evergreen species are partially shaded by their leaves, which limits photoinhibition. Similarly high  $F_v/F_m$  values were found in the needles of the evergreen species ( $> 0.66$ ) and in young stems of other evergreen species, including *Arbutus unedo* L., *Magnolia grandiflora* L., *Pinus nigra* Arnold. and *Quercus ilex* L. (data not shown). Thus,  $F_v/F_m$  may serve as a basis for differentiating among trees based on their sensitivity to cold.

In conclusion, current-year stems of the studied species contained chlorophyll and showed apparent gross photosynthesis. Our data highlight the existence of relationships between stem gross photosynthesis and stem structural traits (i.e., between assimilation and nitrogen and chlorophyll concentrations, and stem mass per area—the equivalent of leaf mass per area). From an ecophysiological viewpoint, the stems appeared to be an extension of the leaves, characterized by a long lifespan and high “leaf” mass per area. The similarity of the relationship between the functional and structural traits of leaf and stem tissues suggests that the evolutionary passage from stem to leaf photosynthetic traits operated by preserving the correlation with structural traits. These results lead to new perspectives on the evolution of stem photosynthesis—particularly, whether stem photosynthesis is a selected characteristic and how leaves were derived from the stem.

#### Acknowledgments

This research was financed by the French projects “Ministère délégué à la recherche—ACI Jeunes Chercheurs” No. JC10009 and “Programme National ACI/FNS ECCO, PNBC” (Convention No. 0429 FNS). The ESE laboratory is supported by the University Paris XI and CNRS.

#### References

- Ackerly, D.D., S.A. Dudley, S.E. Sultan et al. 2000. The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *Bioscience* 50:979–995.
- Arntz, A.M. and L.F. Delph. 2001. Pattern and process: evidence for the evolution of photosynthetic traits in natural populations. *Oecologia* 127:455–467.
- Aschan, G., C. Wittmann and H. Pfan. 2001. Age-dependent bark photosynthesis of aspen twigs. *Trees* 15:431–437.
- Atkin, O.K., J.R. Evans, M.C. Ball, H. Lambers and T.L. Pons. 2000. Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiol.* 122:915–924.
- Björkman, O. and B. Demmig. 1987. Photon yield of  $O_2$  evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504.
- Cernusak, L.A. and J.D. Marshall. 2000. Photosynthetic refixation in branches of Western White Pine. *Funct. Ecol.* 14:300–311.
- Damesin, C. 2003. Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: From the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytol.* 158:465–475.
- Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of  $C_3$  plants. *Oecologia* 78:9–19.
- Field, C. and H.A. Mooney. 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In *On the Economy of Form and Function* Ed. T.J. Givnish. Cambridge University Press, Cambridge, pp 25–55.
- Foote, K.C. and M. Schaedle. 1976. Physiological characteristics of photosynthesis and respiration in stems of *Populus tremuloides* Michx. *Plant Physiol.* 58:91–94.
- Gomez, L. and M. Faurobert. 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Exp. Bot.* 53: 2431–2439.
- Hibberd, J.M. and W.P. Quick. 2002. Characteristics of  $C_4$  photosynthesis in stems and petioles of  $C_3$  flowering plants. *Nature* 415: 451–454.
- Hikosaka, K. 2004. Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes and ecological importance. *J. Plant Res.* 117:481–94.
- Kharouk, V.I., E.M. Middleton, S.L. Spencer, B.N. Rock and D.L. Williams. 1995. Aspen bark photosynthesis and its significance to remote sensing and carbon budget estimates in the boreal ecosystem. *Water Air Soil Pollut.* 82:483–497.
- Krause, G.H. and E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313–349.
- Langenfeld-Heyser, R. 1989.  $CO_2$  fixation in stem slices of *Picea abies* (L.) Karst: microautoradiographic studies. *Trees* 3:24–32.
- Larcher, W. and M. Nagele. 1992. Changes in photosynthetic activity of buds and stem tissues of *Fagus sylvatica* during winter. *Trees* 6:91–95.
- Nilsen, E.T. 1992. Partitioning growth and photosynthesis between leaves and stems during nitrogen limitation in *Spartium junceum*. *Am. J. Bot.* 79:1217–1223.
- Nilsen, E.T. and D. Karpa. 1994. Seasonal acclimation of stem photosynthesis in two invasive, naturalized legume species from coastal habitats of California. *Photosynthetica* 30:77–90.
- Nilsen, E.T., D. Karpa, H.A. Mooney and C. Field. 1993. Patterns of stem photosynthesis in two invasive legumes (*Spartium junceum*, *Cytisus scoparius*) of the California coastal region. *Am. J. Bot.* 80:1126–1136.
- Nilsen, E.T., P.W. Rundel and M.R. Sharifi. 1996. Diurnal gas exchange characteristics of two stem photosynthesizing legumes in relation to the climate at two contrasting sites in the California desert. *Flora* 191:105–116.
- Pfan, H. and G. Aschan. 2001. The existence of bark and stem photosynthesis in woody plants and its significance for the overall carbon gain. An eco-physiological and ecological approach. *Prog. Bot.* 462:477–510.
- Pfan, H., G. Aschan, R. Langenfeld-Heyser, C. Wittmann and M. Loose. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* 89:147–62.
- Pilarski, J. 2002. Diurnal and seasonal changes in the intensity of photosynthesis in stems of lilac (*Syringa vulgaris* L.). *Acta Physiol. Plant.* 24:29–36.
- Poorter, H. and J.R. Evans. 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific area. *Oecologia* 116:26–37.
- Porra, R.J., W.A. Thompson and P.E. Kriedemann. 1986. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations

- for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384–394.
- Reich, P.B., M.B. Walters and D.S. Ellsworth. 1997. From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94:13730–13734.
- Reich, P.B., I.J. Wright, J. Cavender-Bares, J.M. Craine, J. Oleksyn, M. Westoby and M.B. Walters. 2003. The evolution of plant functional variation: traits, spectra and strategies. *Int. J. Plant Sci.* 164:143–164.
- Ripullone, F., G. Grassi, M. Lauteri and M. Borghetti. 2003. Photosynthesis-nitrogen relationships: interpretation of different patterns between *Pseudotsuga menziesii* and *Populus × euroamericana* in a mini-stand experiment. *Tree Physiol.* 23:137–44.
- Rowland, L.J. and R. Arora. 1997. Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. *Plant Sci.* 126:119–144.
- Schmidt, J., F. Batic and H. Pfan. 2000. Photosynthetic performance of leaves and twigs of evergreen holly (*Ilex aquafolium* L.). *Phyton* 40:179–190.
- Staswick, P.E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:303–322.
- Sun, Q., K. Yoda, M. Suzuki and H. Suzuki. 2003. Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *J. Exp. Bot.* 54:1627–1635.
- Wittmann, C., G. Aschan and H. Pfan. 2001. Leaf and twig photosynthesis of young beech (*Fagus sylvatica*) and aspen (*Populus tremula*) trees grown under different light regimes. *Basic Appl. Biol.* 2:145–154.
- Wright, I.J., P.B. Reich, M. Westoby et al. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:821–827.



***III) CARACTERISTIQUES  
PHYSIOLOGIQUES ET  
VARIATIONS SAISONNIERES DE  
LA PHOTOSYNTHESE DES  
TIGES***

---

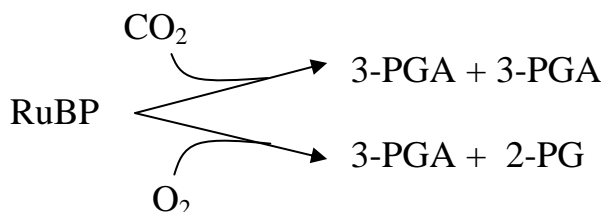


## PRESENTATION

Dans le **chapitre II**, nous avons fait état d'une grande variabilité interspécifique de la photosynthèse des tiges chez les arbres, ce qui nous a permis notamment d'établir des relations significatives entre les échanges gazeux et les plusieurs traits structuraux. Parmi elles, la relation entre la photosynthèse brute et le contenu en azote total qui a été obtenue en été comme en hiver, souligne l'importance de l'azote dans les mécanismes d'assimilation du carbone chez la tige. Cette observation n'est pas nouvelle et est très bien connue chez les feuilles. Les capacités photosynthétiques sont en effet positivement corrélées au contenu en azote car les protéines du cycle de Calvin-Benson-Bassham (cycle CBB, **annexe 1**) contiennent la majeure partie de l'azote foliaire (Evans, 1989).

La Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase), une des enzymes du cycle CBB, intervient (1) dans la fixation du CO<sub>2</sub> et la régulation du métabolisme photosynthétique (e.g. Portis, (1992) et (2) dans la mise en réserve de l'azote (e.g. Millard, (1988). Chez le blé, 20 % de l'azote total est présent dans la Rubisco (Evans, 1989).

La **Rubisco (EC 4.1.1.39)** est une enzyme chloroplastique qui représente environ 40 % des protéines solubles chez les plantes en C<sub>3</sub> (Spreitzer & Salvucci, 2002) ce qui fait d'elle l'enzyme la plus abondante de la planète (Ellis, 1979). Au niveau du cycle CBB, la Rubisco catalyse les réactions de carboxylation du ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) en deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA, molécule à trois carbones, C<sub>3</sub>) ou d'oxygénation du RuBP en une molécule de 2-phosphoglycolate (2-PG) et une molécule de 3-PGA (**figure 15**).

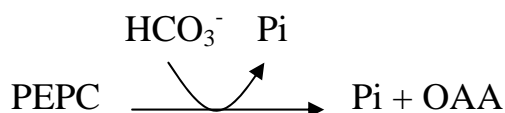


**Figure 15** : réactions de carboxylation et d'oxygénation catalysées par la Rubisco.

Une seule étude a été publiée sur la mesure de l'activité Rubisco dans les tiges d'espèces ligneuses. Il s'agit de celle de Schaedle (1986) qui indique une activité Rubisco de 1.3 μmol CO<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> chl min<sup>-1</sup> mesurée sur l'écorce de jeunes tiges de *Populus tremuloides*. Mais la fixation de CO<sub>2</sub> a lieu également dans les chloroplastes des parties plus profondes de la tige, comme cela a été montré par des marquages au <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Langenfeld-Heyser, 1989).

Cette étude révèle également que la fixation de CO<sub>2</sub> a lieu à l'obscurité. Puisque la Rubisco est inactive à l'obscurité, il existe donc d'autres mécanismes de fixation du CO<sub>2</sub> dans la tige. C'est ainsi que l'hypothèse d'une intervention de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) a été proposée.

La **PEPC (EC 4.1.1.31)** est une enzyme cytosolique qui catalyse la réaction de β-carboxylation du phosphoenolpyruvate (PEP) par une molécule de bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La réaction forme une molécule d'acide oxaloacétique (OAA) et un phosphate inorganique (Pi). La réaction est fortement exergonique et quasi irréversible (**figure 16**).



**Figure 16** : réaction catalysée par la PEPC.

La **PEPC possède différentes fonctions dans la plante** en fonction du métabolisme, de l'organe et de l'isozyme<sup>6</sup> considérés. Dans les feuilles des plantes à métabolisme C<sub>4</sub> (**annexe 3**), le principal rôle de

<sup>6</sup> Isozyme : enzyme présentant une séquence d'acides aminés différente d'une enzyme de référence mais catalysant la même réaction chimique.

la PEPC intervient dans la photosynthèse avec la première étape de fixation du CO<sub>2</sub> par la plante, en formant l'OAA (molécule à quatre carbones, C<sub>4</sub>). Chez les plantes à métabolisme C<sub>3</sub>, c'est la Rubisco qui se charge de cette première étape et la PEPC intervient dans la voie anaplérotique (**annexe 2**), fonction qui compense notamment les pertes en squelettes carbonés du cycle de Krebs, lorsque ce dernier est sollicité dans la formation d'acides aminés (Huppe & Turpin, 1994). Contrairement à la PEPC des plantes C<sub>4</sub>, la PEPC des plantes C<sub>3</sub> n'est que très faiblement activée à la lumière (O'leary, 1982; Lepiniec *et al.*, 1994).

Comme la Rubisco, la PEPC a été très peu étudiée dans les tiges des espèces ligneuses malgré les hypothèses proposées de son intervention dans la refixation de carbone par la tige. Seule une étude a été publiée sur l'activité PEPC dans la tige; elle était détectée sur un extrait de cellules isolées d'écorce de tige (18 ans) de *Robinia pseudoacacia* (Höll, 1974).

Les échanges gazeux effectués en vue de l'estimation de la photosynthèse des tiges sont généralement réalisés de manière instantanée et la plupart des études fournissent uniquement des données sur une courte période. Le **manque d'information sur l'aspect physiologique de la photosynthèse des tiges** et les liens importants entre les échanges gazeux et les traits structuraux tels que les contenus en chlorophylle et en azote (voir **chapitre II**) nous ont conduit à suivre, entre autre, les activités Rubisco et PEPC sur les tiges d'arbre.

L'espèce choisie fût le hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Le hêtre (**figure 17**) est une espèce sciaphile<sup>7</sup> à feuillage caduc de forêts tempérées vivant sur sol calcaire. Les tiges du hêtre ont une écorce lisse et peu développée ce qui rend plus facile les mesures des échanges gazeux et des caractéristiques physico-chimiques.

Au cours de notre étude, nous avons travaillé sur les tiges de l'année de hêtre. Nous avons suivi différents paramètres de la photosynthèse des tiges afin de :

- caractériser la dynamique saisonnière de la photosynthèse des tiges, du contenu et de la localisation en chlorophylle,
- suivre les activités PEPC et Rubisco de la tige tout au long de l'année, en comparaison avec les feuilles.



**Figure 17** : hêtre adulte de 28 ans photographié peu de temps après le débournement (25 avril 2003).

## PRINCIPAUX RESULTATS

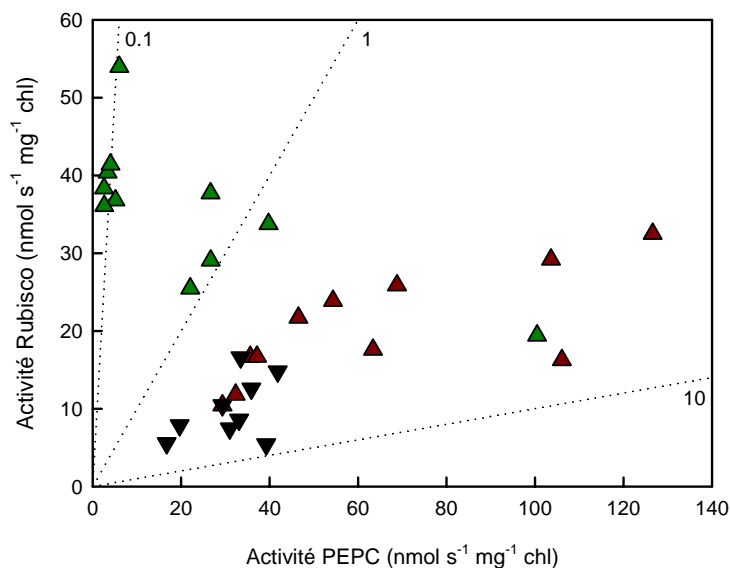
Cette étude a montrée une **dynamique saisonnière de la photosynthèse des tiges** avec un maximum de l'assimilation brute de CO<sub>2</sub> en début de saison (3.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> après le débournement contre 0.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> tout le reste de la saison). Cette dynamique était **en accord notamment avec celle du contenu en chlorophylle** dont la quantité était maximale peu après le débournement puis diminuait progressivement après. La présence d'une période de sécheresse (été 2003) a fortement affectée l'assimilation brute des feuilles alors que la photosynthèse des tiges est restée stable. Contrairement aux feuilles, la tige possède une écorce caractérisée par une faible diffusion des gaz ce qui la rend insensible, jusqu'à une certaine limite, à la sécheresse édaphique.

Au niveau biochimique, les résultats montrent que **l'activité Rubisco est restée faible dans la tige par rapport aux feuilles** (en juin, 10 nmol s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> chl contre 40 nmol s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> chl, respectivement), excepté dans les bourgeons et pendant le débournement, période pendant laquelle les activités entre les deux organes étaient similaires. A ce stade de croissance, les tiges sont très peu

<sup>7</sup> Sciaphile : se dit d'une espèce qui exige ou tolère un éclaircissement faible.

développées, l'écorce est absente et les cellules qui constituent cet organe sont pour la plupart chlorophylliennes, représentant plus de 82 % de la surface de section d'une tige.

Par comparaison avec les feuilles, l'étude a révélée pour la première fois de **très fortes activités PEPC dans la tige**. Exprimée par unité de chlorophylle l'activité PEPC était jusqu'à 13 fois supérieure à celle mesurée dans les feuilles. Exprimée par unité de protéines solubles totales la différence était moins importante : en juin, l'activité PEPC dans les tiges était de  $1.3 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg prot}$  contre seulement  $0.4 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg prot}$  dans la feuille. La **forte activité PEPC pourrait en partie être expliquée par son rôle dans le maintien du pH** cellulaire en jouant sur la balance des concentrations en  $\text{CO}_2$  et  $\text{HCO}_3^-$  mais également sur la synthèse indirecte de malate, acide organique qui intervient dans la régulation du pH. Mais les très fortes concentrations en  $\text{CO}_2$  mesurées dans les tiges (voir **chapitre I**) suggèrent qu'il est préférentiellement dissout dans les espaces intercellulaires et/ou la sève plutôt que dans les cellules, sans quoi le pH cellulaire serait très bas et néfaste au bon fonctionnement des enzymes.



**Figure 18** : relation entre les activités PEPC et Rubisco mesurées sur les tiges de l'année (triangles bruns) et les feuilles de hêtre (triangles verts) au cours de la saison de végétation, et mesurées en juin sur les tiges de l'année des différentes espèces étudiées (triangles inversés noirs). Les valeurs correspondent aux moyennes sur trois arbres. Les lignes en pointillées sont des indications des rapports PEPC/Rubisco (0.1, 1 et 10).

D'autre part, nous avons montré que le **rapport des activités PEPC/Rubisco calculé chez la tige était égal à 2.5** en moyenne sur la saison de végétation. Chez les feuilles, ce rapport est de 5 en début de saison mais passe ensuite rapidement à des valeurs classiques de plantes en  $\text{C}_3$  (**figure 18**). Chez les tiges de l'année de hêtre, le rapport d'activités PEPC/Rubisco reste compris entre 2 et 6 et les différentes espèces d'arbre étudiées dans le chapitre I affichent des rapports généralement compris entre 2 et 4. Ces valeurs sont comprises entre celles mesurées classiquement chez les plantes à métabolisme  $\text{C}_3$  (environ 0.1) et celles mesurées chez les plantes à métabolisme  $\text{C}_4$  (environ 10). En observant l'anatomie de la tige, l'**hypothèse d'un métabolisme de type  $\text{C}_4$**  dans la tige a été avancée. La PEPC pourrait fixer préférentiellement le carbone en profondeur dans la tige, près des vaisseaux xylémiens, là où la concentration en  $\text{CO}_2$  serait très importante (voir **chapitre I**). Comme dans un métabolisme de type  $\text{C}_4$ , le malate issu indirectement de la fixation du  $\text{CO}_2$  par la PEPC serait ensuite transporté vers les cellules de l'écorce, où la concentration en chlorophylle est importante. Les réactions photochimiques utilisant la Rubisco auraient lieu à ce niveau, en utilisant partiellement le  $\text{CO}_2$  libéré par la décarboxylation du malate. Afin de **vérifier partiellement cette hypothèse**, l'activité de l'enzyme malique à NADP (NADP-ME, enzyme décarboxylante) a été suivie. Il s'est avéré que la **NADP-ME avait une forte activité dans la tige**, en comparaison avec la feuille.

Bien que la NADP-ME soit sollicitée dans la tige pour la fourniture de NADPH à la synthèse de lignine, l'**hypothèse d'un métabolisme de type  $\text{C}_4$**  est toutefois valable mais discutable. En effet, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait montrer une localisation différentielle des deux enzymes, e.g. la PEPC en profondeur et la Rubisco en périphérie.





**ARTICLE :**

**CARBON ASSIMILATION BY TREE STEMS: POTENTIAL INVOLVEMENT OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE**

BERVEILLER Daniel & DAMESIN Claire

*Trees – Structure and Function*, **27**: 149-157

Avril 2008



# Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase

Daniel Berveiller · Claire Damesin

Received: 4 July 2006 / Revised: 29 March 2007 / Accepted: 5 April 2007 / Published online: 19 December 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** In woody species, the photosynthesis of stems, especially young branches, occurs by re-fixing part of the internal respiratory CO<sub>2</sub>. The present study aims to improve the physiological characterization of stem photosynthesis by examining enzymatic characteristics. During an entire growing season, three enzymatic activities that are linked to C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> metabolism were investigated in relation to the CO<sub>2</sub> efflux and chlorophyll content of current year stems of European beech and were compared to the corresponding characteristics of leaves. High activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and NADP malic enzyme were detected in stems (up to 13 times and 30 times higher in stems than in leaves, respectively), whereas Rubisco activity remained low in comparison with leaves. Stem maximal Rubisco and PEPC activities occurred at the beginning of the season when the total chlorophyll content and the CO<sub>2</sub> assimilation rate were also maximal. Stems were characterized by a PEPC:Rubisco ratio that was equal to 2.5 [an intermediate value between that of C<sub>3</sub>-plants (about 0.1) and that of C<sub>4</sub>-plants (about 10)], whereas it was equal to 0.1 in leaves. Eight other tree species were also measured and the PEPC:Rubisco ratio was, on average, equal to 3.6. The potential role of PEPC in

stem carbon assimilation is discussed in relation to its known involvement in the anaplerotic function of C<sub>3</sub> plants and in the carbon metabolism of the C<sub>4</sub> pathway.

**Keywords** Stem photosynthesis · Rubisco · PEPC · NADP ME · Chlorophyll

## Abbreviations

Rd	CO <sub>2</sub> efflux in the dark (or dark respiration rate)
Rl	Mean CO <sub>2</sub> efflux in the light
Pg	Apparent gross photosynthesis rate
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase
NADP ME	NADP malic enzyme

## Introduction

In the stems of tree species, the high rates of growth and maintenance respiration, coupled with the lack of stomata and the low permeability of stem peridermal layers to gaseous diffusion, lead to a rise in CO<sub>2</sub> concentration inside the stems. Published values of CO<sub>2</sub> concentrations in intercellular air spaces vary considerably, but are in the range of 1–26% (Pfanzen et al. 2002). Compared with CO<sub>2</sub> concentrations that are commonly measured in leaves of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and crassulacean acid metabolism plants (von Caemmerer and Farquhar 1981), the concentrations measured in stems are higher by a factor of approximately 500–800. These high CO<sub>2</sub> concentrations in stems raise several questions, especially in relation to pH and oxygen availability. The values of pH, as measured by microelectrodes,

Communicated by H. Pfanz.

D. Berveiller (✉) · C. Damesin  
CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution,  
UMR8079, Orsay 91405, France  
e-mail: daniel.berveiller@u-psud.fr

D. Berveiller · C. Damesin  
Univ Paris-Sud, Orsay 91405, France

D. Berveiller · C. Damesin  
AgroParisTech, Paris 75231, France

are generally between 5.2 and 6.8 for xylem sap samples of tree species (McGuire and Teskey 2002; Alves et al. 2004)—that is, values for which the  $\text{CO}_2$  form is predominant—and the stem internal  $\text{O}_2$  concentration varies between 5 and 21% (Pfanz et al. 2002). Under these conditions, the carboxylase function of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is a priori more efficient than the oxygenase function, and photorespiration would be a priori seriously reduced, indeed nonexistent. Currently, there are two recent studies on this subject, the first suggesting that photorespiration may be occurring in stems of *Prunus persica* (Alessio et al. 2005), and the second on *Betula pendula*, showing that photorespiration is probably negligible (Wittmann et al. 2006).

The data currently available on the enzymatic aspects of stem (or corticular) photosynthesis are particularly poor. A Rubisco activity was detected in the bark tissues of 3-month-old stems of *Populus tremuloides* (Schaedle and Brayman 1986). As several studies highlighted the presence of chlorophyllous cells far inside the stems of most tree species (Langenfeld-Heyser 1989; Berveiller et al. 2007), we could expect a potential role of these cells in stem carbon assimilation. Hibberd and Quick (2002) highlighted the high activities of three carboxylation enzymes (NAD and NADP malic enzymes, and PEP carboxykinase) in chlorophyllous cells that are located near the vascular bundles of tobacco stems, compared with leaves. Although tobacco is a  $\text{C}_3$  plant, the authors concluded that biochemical attributes similar to those needed in  $\text{C}_4$  photosynthesis are associated with photosynthesis around the vascular system of tobacco stems. In tree species, the pathway of stem carbon assimilation has not yet been examined, but some indications suggest that there is some phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) involvement. It has been shown that pith and xylem cells of *Picea abies* stems were able to fix  $^{14}\text{CO}_2$  in the dark (Langenfeld-Heyser 1989), suggesting that light-independent mechanisms could take part in the stem  $\text{CO}_2$  incorporation. Furthermore, cell-free preparations of the trunk wood of 18-year-old *Robinia pseudoacacia* have incorporated  $^{14}\text{CO}_2$  in the presence of phosphoenolpyruvate, the substrate of PEPC (Höll 1974). Stem photosynthesis, in terms of  $\text{CO}_2$  exchange, is highly variable among species, as can be seen in the study of Berveiller et al. (2007) where a variety of correlations commonly observed for leaves were established for current-year stems, especially between gross photosynthesis rate ( $P_g$ ) and the nitrogen content or chlorophyll content. This interspecific variability in stem carbon assimilation might also be explained by variability in the carboxylating enzymatic activity.

The present work deals with the enzymatic aspects of stem photosynthesis and, in particular, the activities of three enzymes that are involved in the photosynthesis of  $\text{C}_3$

and/or  $\text{C}_4$  plants (Rubisco, PEPC and NADP ME). More precisely, the objectives were (1) to check the presence of Rubisco and PEPC activity in stems and to examine their seasonal variations in relation to those of stem gas exchange and chlorophyll content, and (2) to examine the possible involvement of PEPC and NADP ME in stem carbon assimilation by comparing their activities in stems and leaves and by investigating stems from different tree species. In this study, the enzymatic activities were monitored over 1 year in current-year stems and leaves of European beech, simultaneously with the  $\text{CO}_2$  exchange and chlorophyll content. The enzymatic activities were also investigated in the current-year stems of eight other tree species that were previously characterized by gas exchange for their stem photosynthesis (Berveiller et al. 2007).

## Materials and methods

### Site description and plant materials

The experiment was conducted on the campus of the University of Paris-Sud (48°42'N, 02°10'E), 25 km southwest of Paris, France. The soil is a brown soil in the process of formation, on top of colluviums.

The seasonal monitoring of the various parameters described below was conducted in 2003 on three 23-year-old isolated European beech trees (*Fagus sylvatica* L.). In 2003, the mean annual precipitation was 570 mm. The annual minimum and maximum temperatures were  $-5^\circ\text{C}$  in January and  $39^\circ\text{C}$  in August, respectively. The summer period was particularly hot and dry. The water constraint was estimated from the end of June (just after the beginning of the drought period) by measuring the predawn water potential ( $\Psi_{pd}$ ) on beech leaves using the Scholander pressure chamber method (Scholander et al. 1965). Sun-exposed stems grown in 2003 and sun-exposed leaves were studied (from a height of 2 m). Each month (more frequently during the beginning of the growth period), leaves and whole segments of three current-year stems were harvested from each tree (in mid-afternoon around 1530 UT), immediately immersed in liquid  $\text{N}_2$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until enzyme and chlorophyll assays were performed.

The interspecific variability in enzymatic activities was performed on the same European beeches described above, plus eight other tree species: common oak (*Quercus robur* L.), small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.), silver birch (*B. pendula* Roth.), ash (*Fraxinus excelsior* L.), alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), Norway spruce (*P. abies* (L.) Karst), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). These trees were of roughly the same height (15–20 m), and of the same age (35–50 years).

Enzyme activities were measured on whole segments of three current-year stems that were sampled from three isolated trees in June 2004.

Although the detection of chlorophyllous cells (Berveiller et al. 2007) and the fixation of  $^{14}\text{CO}_2$  (Langenfeld-Heyser 1989) in the pith of the stems have been shown on slides, we cannot exclude a potential photosynthetic activity in the medullary parenchyma. For this reason, we considered the whole stem and not only the bark as proposed by Nilsen (1995) for photosynthesis occurring in tree branches and twigs. We are currently working on the cytolocalization of Rubisco and PEPC inside stems. Further details will be outlined in a subsequent paper.

### Gas exchange measurements

Gas exchange measurements were achieved with the LI-6400 portable photosynthesis system (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Two different chambers were used: the model 6400-40 for leaves and the model 6400-05 (the “conifer chamber”) for current-year stems, similar to the one described by Damesin (2003). When a sample was collected, the stem was immediately recut under distilled water in the section of tissue that was produced the previous year. A part of the current-year stem was immediately placed in the chamber and the cut end of the stem was kept submerged in water during measurements. Current-year stems were placed in the chamber, as in natural conditions—that is, the sun-exposed upper part was lightened.

Measurements were made at 20°C, with a  $\text{CO}_2$  concentration of 390 ppm and 50–60% relative humidity under 1,400 and 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation (PAR), which allowed determination of  $\text{CO}_2$  efflux rate in the light (Rl) and the  $\text{CO}_2$  efflux in the dark, i.e., dark respiration rate (Rd), respectively. Contrary to the chamber model 6400-40, in which a light source is incorporated (6400-02B Red/Blue LED), the model 6400-05 is exempt from a light source. Thus, gas exchange was measured on detached stems in the laboratory. A mercury light source (2 × 1000 W HQI; OSRAM, München, Germany) was placed 1 m above the chamber. Moreover, a small laboratory-made gallium arsenide phosphide PAR sensor, calibrated with the Li-Cor PAR sensor located in the leaf chamber, was installed in the 6400-05 chamber close to the stem sample. Under both light conditions, samples were acclimated for 15–20 min before measurements were made.  $\text{CO}_2$  efflux was measured five to ten times at 30-s intervals. The system was confirmed as airtight by blowing around the chamber for each measured sample. Gas exchange measurements were performed on nine different leaves and nine different stems (i.e., three

stems and three leaves per tree). To calculate the stem mass per area, stem areas were measured and the tissues were oven-dried at 60°C for 48 h. The observed decrease of  $\text{CO}_2$  efflux under the light regime is linked to photosynthesis [(proved by  $^{14}\text{CO}_2$  labelling (Langenfeld-Heyser 1989); see also experiments with Clark-type  $\text{O}_2$  electrode in (Pfanzen and Aschan 2001)] and possibly to light inhibition of respiration [this was shown in leaves (Atkin et al. 2000) but was never examined in stems]; however, we were unable to distinguish between these two effects. In this study, the difference obtained by subtracting Rd from Rl was referred to as the apparent Pg.

### Chlorophyll content

Chlorophyll content was determined using *N,N*-dimethylformamide (DMF) as the extraction solvent. For each leafy stem, two or three discs were sampled on three different leaves, and the proximal half of the second internode of the stem was sampled. Each stem was cut finely with a pair of pruning shears. Then, samples were placed in 4 ml DMF, at 65°C in darkness for 2 h. After that, tubes were incubated for 1 h at room temperature. At the end of the incubation period at 65°C, samples were colourless. Without centrifugation, the absorbance of the clear supernatant was measured at 663.6 and 646.6 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 18; PERKIN ELMER, Shelton, CT, USA). The amounts of chlorophyll *a* and *b* were calculated according to a previously published method (Porra et al. 1986). Five other leaf discs, and the part of the stem that was not used for chlorophyll measurements, were oven-dried at 60°C for 48 h to determine the corresponding dry weight. The results presented correspond to five dates: the date of budburst (4 April), plus the dates chosen for chlorophyll localization in the stems.

### Determination of chlorophyllous cell area

We estimated, on four dates throughout the year, the chlorophyllous cell area in a stem section: 1 day just after budburst (24 April), two in the middle of summer (18 June and 26 August), and one after leaf fall (8 December). Chlorophyll visualization was performed with an epifluorescence microscope (ZEISS; Rödermark, Germany), which was equipped with a blue excitation filter (BP 450–490) and an emission filter (LT 520) and linked to a computer. Images were acquired with an Insight camera, and image contrast enhancement was carried out using diagnostic imaging advanced SPOT software (Diagnostics Instruments INC.; Sterling Heights, MI, USA). The chlorophyll cells were visualized by bright red fluorescence,

which is characteristic of chlorophyll. A spectral analysis was performed using confocal microscopy (LEICA; Microsystems, Wetzlar, Germany) to confirm that the entire red emission corresponded to chlorophyll (peak at 690 nm).

Images were first treated with Photoshop 7.0.1 (Adobe) to discard background noise from the epifluorescence microscope. Then, they were analysed under ENVI 3.1 (Research System Inc., Boulder, CO, USA). The method of analysis was based on a K-means clustering algorithm, which enables the classification of image pixels according to their intensity (five classes and three iterations). Finally, we estimated the number of relevant pixels in comparison with the total number of pixels in the area of the stem.

### Protein extraction and quantification

Frozen materials (300 mg) of leaves and whole stems segments were weighed rapidly, powdered with a pestle in a prechilled mortar under liquid N<sub>2</sub> and ground in an extraction buffer containing 100 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 6% (w/w) polyvinylpyrrolidone K25, 7% (w/w) polyethylene glycol 20000, 2 mM dithiothreitol, 10% (v/v) glycerol, and three antiproteases: 20 μM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride (*p*-APMSF), 1 μM pepstatin and 1 μM leupeptin. During grinding, 50% (w/w) polyvinylpolypyrrolidone was added. The homogenates were centrifuged for 30 min at 4°C in a microcentrifuge (5804 R; EPPENDORF, Germany) at 12,500g. A portion of the supernatant was used for protein determination. The remainder was passed through a desalting column (Sephadex G25<sup>TM</sup> Pharmacia; AMERSHAM, Sweden) for enzyme assays. Soluble protein concentrations were determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976).

### Enzyme assays

Phosphoenolpyruvate carboxylase activity was measured in a buffer containing 112 mM Tris (pH 8.5), 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 mM NADH, 2 mM glucose 6-phosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 3 U ml<sup>-1</sup> malate dehydrogenase. This assay was initiated by the addition of 5 mM of phosphoenolpyruvate (Uedan and Sugiyama 1976; Tietz and Wild 1991).

Rubisco total activity was measured in a buffer containing 100 mM Bicine (pH 8), 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U ml<sup>-1</sup> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5 U ml<sup>-1</sup> 3-phosphoglycerokinase, 5 U ml<sup>-1</sup> creatine phosphokinase, 5 mM creatine phosphate, 0.25 mM NADH, 3.5 mM ATP. This assay was initiated

by the addition of 0.5 mM of ribulose-1,5-bisphosphate after 10 min incubation of the extract at 30°C.

NADP ME activity was measured in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 0.5 mM NADP and 30 mM malate. This assay was initiated by the addition of 10 mM EDTA. A control was made with 5 mM MnCl<sub>2</sub> instead of the EDTA.

The enzymatic activities were determined following NADH oxidation for Rubisco and PEPC and, following NADP reduction, for NADP ME at 340 nm. Activity was expressed, for Rubisco, as nmol CO<sub>2</sub> consumed per second in relation to total chlorophyll content and, for PEPC and NADP ME, as NADH (or NADP) per second in relation to total chlorophyll content.

### Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using “Statistica” software (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistical significance between leaves and stem gas exchange and the species effect in interspecific comparison of enzymatic activities. The specific differences in enzymatic activities and chlorophyll content were tested using Student’s *t* test.

## Results

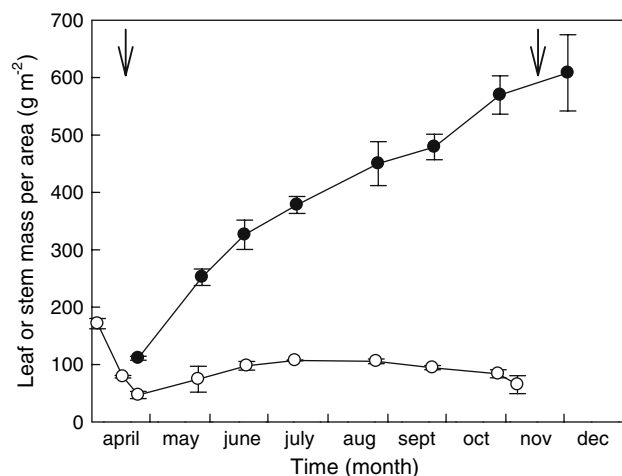
### Phenology

Budburst occurred between 17 and 20 April 2003 (Fig. 1). Individual leaf area increased quickly after budburst and reached its maximum level at the beginning of May (16 cm<sup>2</sup> on average). The leaf mass per area (LMA) decreased before budburst and then increased to reach 107 g m<sup>-2</sup> in July, whereas the stem mass per area progressively increased throughout the year.

### Seasonal variations of CO<sub>2</sub> efflux and predawn leaf water potential

The maximal Pg occurred at the end of May, reaching 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Fig. 2a). We observed a large decrease in leaf Pg between the end of May and July. Stem gross photosynthesis was the highest just after budburst (3.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> or 31.9 μmol kg<sup>-1</sup> DW s<sup>-1</sup>) and remained low (about 0.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) throughout the year. Leaf-stem differences in Pg were statistically significant except at the end of May (budburst period) and July (drought period).

Until July, Rd decreased (in absolute value) in leaves and stems, varying from -4 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for stems and



**Fig. 1** Leaf (or stem) mass per area of leaves (*open circles*) and current-year stems (*solid circles*). Stem area has always been measured for a constant stem length. Points are mean  $\pm$  SE. *Black arrows* indicate budburst in April and leaf-fall in November

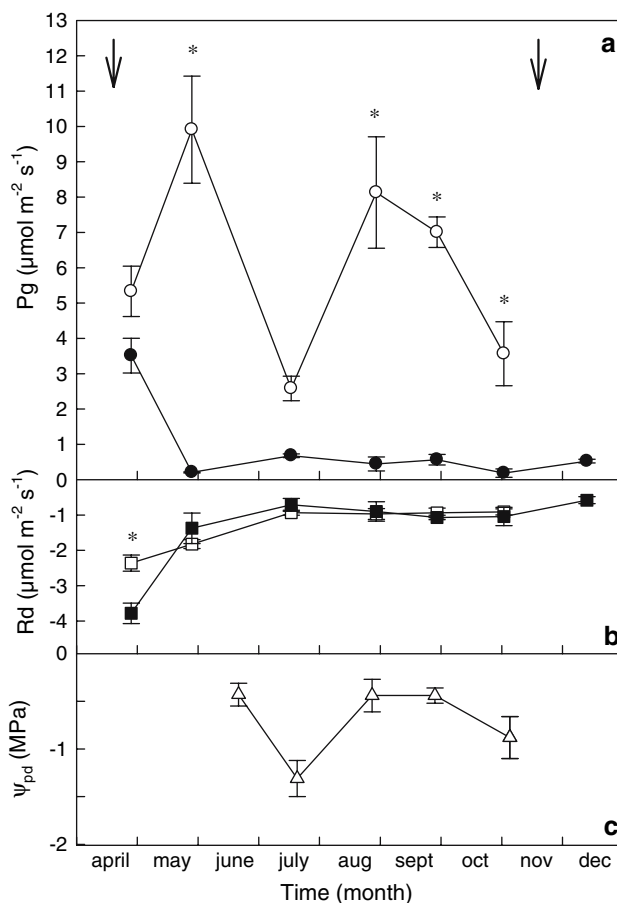
$-2.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for leaves at the end of April to around  $-1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for both tissues in July (Fig. 2b). After this period, Rd remained stable for stems and leaves. Leaf Rd was significantly different from that of stems at the end of April.

Between June and August, a hot and dry period occurred, and predawn leaf water potential,  $\Psi_{\text{pd}}$ , reached  $-1.88 \text{ MPa}$ , on average, in August (Fig. 2c). Later in the year, values were around  $-0.5 \text{ MPa}$ . The water constraints led to a large decrease in leaf assimilation, but this had less influence on that of stems.

#### Seasonal variations of chlorophyll content, chlorophyll *a/b* ratio and stem chlorophyll distribution

At the bud stage, the chlorophyll content was three times higher in stems than in leaves (Table 1). On 24 April, the chlorophyll content in leaves was four times higher than in stems. After budburst (24 April), stem chlorophyll content decreased, whereas leaf chlorophyll content continued to increase. Between June and the leaf-fall period, chlorophyll content progressively decreased as much as 95% in leaves. In stems, it remained low ( $0.25 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  on 8 December). Chlorophyll *a/b* values were between 1.7 and 2.4 times lower in stems than in leaves, except at budburst and leaf-fall. The chlorophyllous cell area was high just after budburst, amounting to 82.3%. For the three later dates, it remained between 47.2 and 50.9%. These results were consistent with the values of stem chlorophyll concentration (Chl. *a + b*), as the same pattern has been observed (Table 1).

The chlorophyll was evenly distributed in parenchyma tissues (cortical and medullary parenchyma) on the stem



**Fig. 2** Seasonal variation of **a** area-based gross photosynthesis rate ( $\text{Pg} = \text{RI} - \text{Rd}$ ) in leaves (*open circles*) and current-year stems (*solid circles*), **b** area-based dark respiration rate in leaves (*open squares*) and stems (*solid squares*), and **c** pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{\text{pd}}$ ). Points are mean  $\pm$  SE. *Black arrows* indicate budburst in April and leaf-fall in November

sections that were sampled in April (Fig. 3a). At this time, the peridermal layers were totally red, and thus possessed chlorophyllous cells. In December (Fig. 3b), chlorophyll was more represented in medullary parenchyma and xylem than in cortical parenchyma and less in peridermal layers. These layers showed green and yellow fluorescence, which is characteristic of polyphenols and lignin accumulation.

#### Seasonal variations of enzymatic activities and total soluble protein content

The Rubisco activity was similar for leaves and stems in buds and during the budburst period (around  $18 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ chlorophyll}$ , Fig. 4a). Following this, the activity in stems decreased and remained lower than in leaves until November, with values ranging between 10 and  $20 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ chlorophyll}$ . For stem PEPC, the pattern of activity, beginning with budburst, was similar to



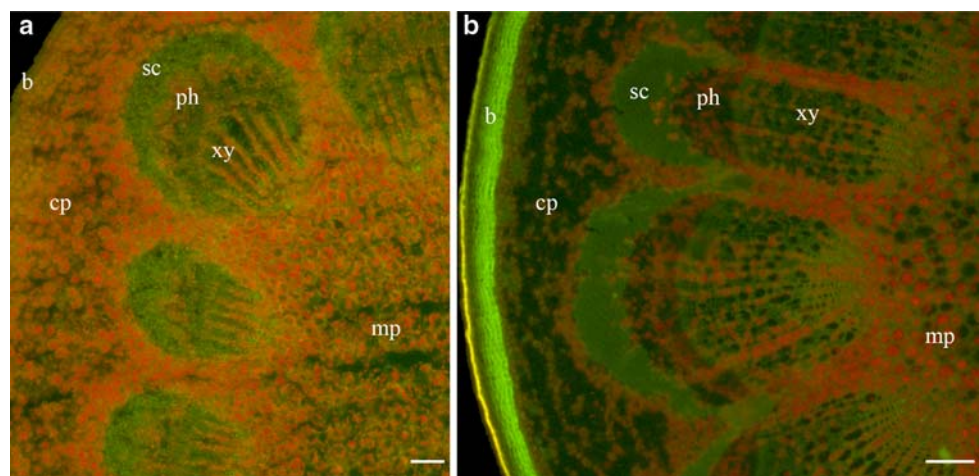
**Table 1** Dry-matter-based chlorophyll content and chlorophyll *a/b* ratios of leaves and current-year stems selected for five dates in 2003 (Bud stage: 4 April; end of budburst period: 24 April)

		Bud stage	April 24	June 18	August 26	December 8
Leaves	Chl. <i>a + b</i> (mg g <sup>-1</sup> )	0.34 ± 0.03	4.33 ± 0.13	5.38 ± 0.98	3.67 ± 0.27	
	Chl. <i>a/b</i>	2.73 ± 0.21	3.70 ± 0.09	3.69 ± 0.02	3.32 ± 0.08	
Stems	Chl. <i>a + b</i> (mg g <sup>-1</sup> )	1.05 ± 0.21	1.12 ± 0.07	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.05	0.25 ± 0.03
	Chl. <i>a/b</i>	1.91 ± 0.09	2.39 ± 0.11	1.97 ± 0.02	1.85 ± 0.01	2.02 ± 0.03
	Chl. cell area (%)		82.30 ± 0.88	47.19 ± 0.75	50.06 ± 0.56	50.86 ± 0.62
	Chl. <i>a + b</i>	*	***	***	***	
	Chl. <i>a/b</i>	*	***	***	**	

The chlorophyllous cell area was also presented as the percentage of the total surface of the stem section. Data are mean ± SE, with  $3 \leq n \leq 9$  for Chl. *a + b* and Chl. *a/b* values, and  $n > 10$  for Chl. cell area

Significant differences between leaves and stems: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

**Fig. 3** Comparison of chlorophyll distribution on current-year stems sections sampled in April (a) and December (b). *cp* cortical parenchyma, *mp* medullary parenchyma, *ph* phloem vessels, *sc* sclerenchyma, *xy* xylem vessels. Scale bar = 70 μm (a), 150 μm (b)



that observed for leaves from the bud stage onwards, albeit with a 1-month lag (Fig. 4b). Between the end of May and November, PEPC and Rubisco activities progressively increased. During summer, PEPC activity was about 13 times higher in stems than in leaves. Expressed in protein units, PEPC activity was three times higher in stems than in leaves, which indicates that this difference between the two tissues is not due to a difference in the yield of protein extraction. NADP ME activity was always higher in stems than in leaves (Fig. 4c). After budburst, enzymatic activity decreased in leaves and remained stable throughout September, whereas it increased in stems. During the whole season, PEPC and NADP-ME activities were significantly higher in stems than in leaves, and the leaf-stem differences were always significant ( $P < 0.05$ ).

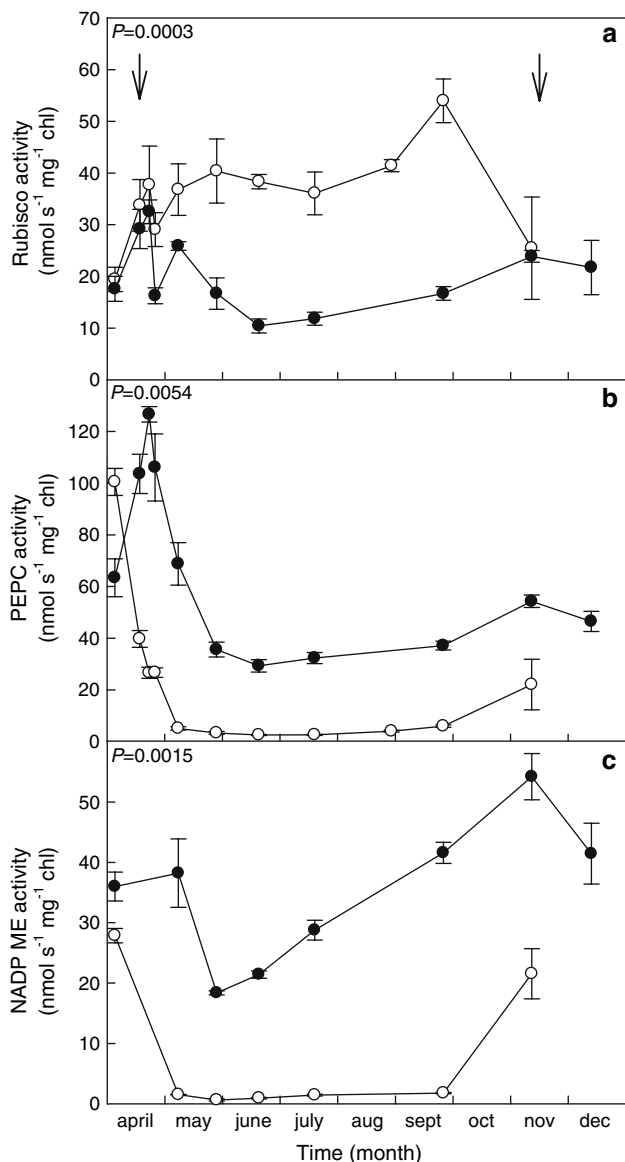
Total soluble protein content changed according to the physiological activity of leaves and stems (Fig. 5). Soluble protein content was always lower in stems than in leaves, except at budburst. For example, values were 34.4 and 8.6 μg mg<sup>-1</sup> DW in June for leaves and stems, respectively.

#### Interspecific variability of enzymatic activities

The Rubisco, PEPC and NADP-ME activities measured in current-year stems were highly variable between the eight species (Fig. 6). There was, systematically, a significant species effect on enzymatic activities:  $P < 0.005$  for PEPC activity and  $P < 0.001$  for Rubisco and NADP-ME activities. Nevertheless, for all species, the PEPC activity was always significantly higher than the Rubisco activity. Moreover, the PEPC activity was also significantly higher than NADP-ME activity except in *A. glutinosa* and *F. excelsior*. The greatest PEPC activity (around 40 nmol s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> chlorophyll) has been measured in *P. abies* and *P. sylvestris*. The greatest Rubisco and NADP-ME activities (16.6 and 24.9 nmol s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> chlorophyll, respectively) were measured in *F. excelsior*.

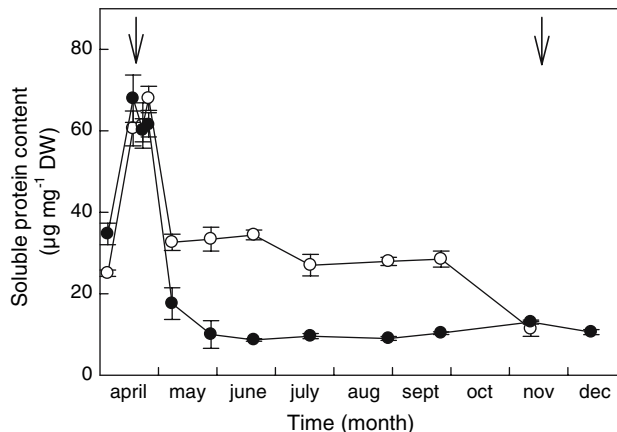
#### Discussion

Pg was obviously higher in leaves than in current-year stems throughout the entire season, except during budburst



**Fig. 4** Seasonal variation of **a** Rubisco activity; **b** phosphoenolpyruvate carboxylase (*PEPC*) activity; and **c** NADP malic enzyme (*NADP ME*) activity in leaves (*open circles*) and stems (*solid circles*). The *P* value indicates the statistical difference in enzymatic activities between leaves and stems during the whole season. Points are mean ± SE. *Black arrows* indicate budburst in April and leaf-fall in November

and during the drought stress, during which the leaf-stem difference was not significant. The stem maximal values were similar to those mentioned in the literature (Pfan­z et al. 2002) and to those obtained for the same species by Damesin (2003). The natural drought stress that occurred in July 2003 had no negative effect on stem photosynthesis, whereas leaf photosynthesis decreased from 10 to 2.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> between the end of May and July. The pattern of dark respiration was very similar (no significant difference) between leaves and current-year stems, except in the budburst period. The maximum *Pg* that was

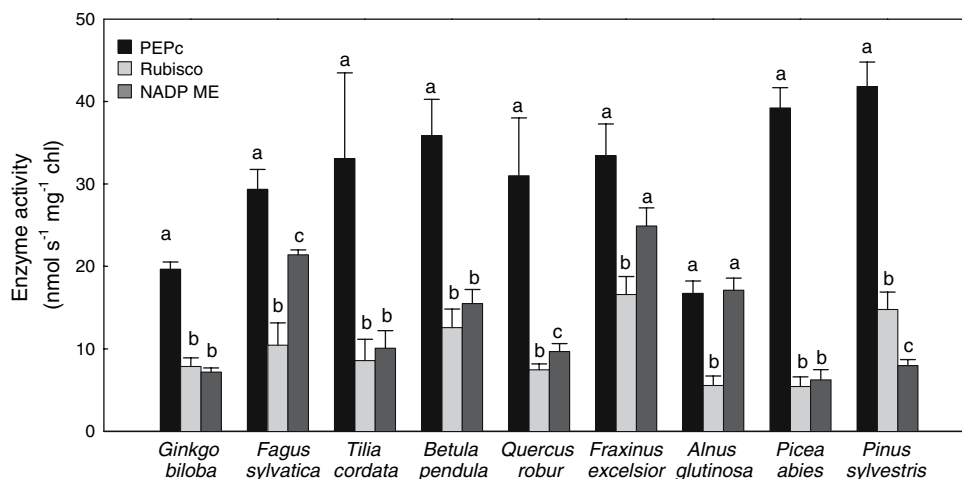


**Fig. 5** Seasonal variation of total soluble protein content in leaves (*open circles*) and current-year stems (*solid circles*). Points are mean ± SE. *Black arrows* indicate budburst in April and leaf-fall in November

measured for current-year stems occurred during budburst when tissues are immature (i.e., low stem mass per area), whereas for leaves it occurred at the end of May (i.e., when LMA reached about 100 g m<sup>-2</sup>). The maximal photosynthetic rate of current-year stems occurred when the total chlorophyll content and the Rubisco and PEPC activities were maximal. The difference between leaf and stem in contribution to their “photosynthetic biochemical machinery” appears early in the season, just after the budburst period (end of April). Indeed, the chlorophyll content and the Rubisco activity in stems—both expressed in dry matter units (data not shown)—were already low in comparison with leaves whereas the soluble protein content was still similar for leaves and stems just after budburst.

The stem chlorophyll content was consistent with published values for the same species (Pfan­z et al. 2002; Damesin 2003). The high chlorophyll values observed during the budburst period could explain, in part, the high values of the stem photosynthesis rate. The decrease in chlorophyll content in stems after the budburst period was probably linked to tissue growth, which was caused at least in part by the decrease in light penetration inside the stems, resulting from radial growth. Most studies showed the presence of chlorophyll inside the stems, with an abundance in the cortical parenchyma (van Cleve et al. 1993; Wittmann et al. 2006; Berveiller et al. 2007). The location of chlorophyllous cells near xylem vessels could be advantageous in terms of the carbon source. Indeed, Hibberd and Quick (2002) have shown in celery and tobacco that malate, a potential carbon source arising from the roots, could be decarboxylated in chlorophyllous cells that border the vascular system of the stems. In *F. sylvatica*, the first step of carbon assimilation by PEPC could take place directly in the stems. Another explanation for this particular distribution would be the presence of light inside the

**Fig. 6** Interspecific comparison of PEPC, Rubisco and NADP ME activities among various tree species. Activities were measured on current-year stems sampled in June 2004. Letters (a, b, and c) indicate significant differences between enzymatic activities for a given species. Bars are mean + SE



stems. It is surprising because only 0.01% of the incident red light (660 nm) reaches the pith of a 1-year-old stem of *F. sylvatica* (Pfanzen et al. 2002). A recent study has also shown that vessel fibres and tracheids in woody plants can conduct light efficiently along the axial direction of stems, via their lumina or cell walls (Sun et al. 2003).

Although Rubisco exhibited an activity four times higher in leaves than in current-year stems, PEPC activity was more than ten times higher in current-year stems than in leaves. The enzyme activities were measured on samples harvested in light conditions. Höll (1974) showed that cell-free preparations of the wood of *R. pseudoacacia* fixed CO<sub>2</sub> in dark conditions, especially by the PEPC-driven dark pathway. This possibility has to be checked to show if any difference occurred between PEPC activities in stems under dark or light conditions. At the seasonal scale, no correlation has been shown between Pg and Rubisco activity or Pg and PEPC activity for *F. sylvatica*. The same result was obtained from the interspecific data [Pg data from Berveiller et al. (2007) and PEPC activities from this study] The PEPC:Rubisco ratio was equal to 0.095 in leaves (a classical value of C<sub>3</sub> plants) of *F. sylvatica* between May and September, whereas it was equal to 2.5 in current-year stems (an intermediate value between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants) for the same period. In the various other studied tree species, the PEPC:Rubisco ratio varied between 2 and 4, except for *P. abies*, for which it was equal to 7. Expressed in a protein based unit, the range of PEPC:Rubisco ratio was from 1.4 to 2.2 (3.8 for *P. abies*). One explanation for the high PEPC activity in stems would be that, as in C<sub>4</sub> metabolism, PEPC supplies malate for NADP ME and then, by malate decarboxylating, NADP ME supplies CO<sub>2</sub> for Rubisco. This would explain, in part, the high activity of NADP ME that is detected in stems. Furthermore, an immunohistochemical study has shown the presence of PEPC and NADP ME around the

vasculature of grape berries (Famiani et al. 2000). These two enzymes are also localized in the same tissues of beech stems. A two- to fourfold elevation in the activity of cytoplasmic NADP ME has been observed in potato plants in which the PEPC gene (*ppc*) was overexpressed (Hausler et al. 2001). It seems that these two enzymes are closely linked and that stems probably invest more energy in PEPC and NADP-ME production than leaves. The high NADP-ME activity in comparison to leaves also may be explained by the generally high NADPH demand during lignin biosynthesis [particularly at the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) step], which carries on late into the growing season in stems, as was seen by the presence of yellow fluorescence in the stem slices sampled in December.

A second explanation would be that, in stems, PEPC indirectly plays a part in nitrogen assimilation. Indeed, in C<sub>3</sub> plants, PEPC takes place in the anaplerotic fixation of CO<sub>2</sub> and the synthesis of dicarboxylic acids that are used as respiratory substrates (Rosendahl et al. 1990; Lasa et al. 2002). By delivering a carbon skeleton to the Krebs cycle, the high PEPC activity probably leads to an increase of 2-oxoglutarate, which is a precursor of nitrogen assimilation, leading to amino-acid synthesis. This hypothesis was also proposed by Höll (1974) to explain the high amount of <sup>14</sup>C detected in aspartic acid, which is a precursor of amino-acid production. Moreover, because of the high CO<sub>2</sub> concentration inside the stems, the pH of the beech bark is around 5.5 (Pfanzen and Aschan 2001) and, in these conditions, the main form of carbon is CO<sub>2</sub>. In order to maintain a suitable pH for cellular activity, PEPC certainly plays a part in the CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> balance, as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is the substrate of PEPC. It would be interesting to examine carbonic anhydrase activity to determine its importance in the CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> balance inside stem tissues in relation to PEPC activity.

## Conclusion

In contrast with leaves, stems exhibited a high PEPC activity and a low Rubisco activity, the highest activities occurring when CO<sub>2</sub> gas exchange was the highest. The leaf PEPC:Rubisco ratio that was measured in current-years stems of all studied species was intermediate between C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-plants. Establishing PEPC characteristics (pH, PEPC and malate sensitivities) of stems in comparison with leaves could let us to know if stem PEPC is close to that of C<sub>4</sub>. The particular location of chlorophyllous cells near the xylem and the high NADP-ME activity measured in stems suggest the use of a potential source of carbon that arises from xylem vessels, but further investigations (especially immunocytolocalization of PEPC and Rubisco inside stems) are needed to confirm this hypothesis.

**Acknowledgments** This research was financed by the French projects “Ministère délégué à la recherche—ACI Jeunes Chercheurs” no. JC10009 and “Programme National ACI/FNS ECCO, PNBC” (convention no. 0429 FNS). The ESE laboratory is supported by the University Paris XI and CNRS.

## References

- Alessio GA, Pietrini F, Brilli F, Loreto F (2005) Characteristics of CO<sub>2</sub> exchange between peach stems and the atmosphere. *Funct Plant Biol* 32:787–795
- Alves G, Ameglio T, Guillot A, Fleurat-Lessard P, Lacoite A, Sakr S, Petel G, Julien J-L (2004) Winter variation in xylem sap pH of walnut trees: involvement of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of vessel-associated cells. *Tree Physiol* 24:99–105
- Atkin OK, Evans JR, Ball MC, Lambers H, Pons TL (2000) Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiol* 122:915–924
- Berveiller D, Kierzkowski D, Damesin C (2007) Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. *Tree Physiol* 27:53–61
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Damesin C (2003) Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytol* 158:465–475
- Famiani F, Walker RP, Tecsli L, Chen Z-H, Proietti P, Leegood RC (2000) An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *J Exp Bot* 51:675–683
- Hausler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch H-J (2001) Single and double overexpression of C<sub>4</sub>-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J Exp Bot* 52:1785–1803
- Hibberd JM, Quick WP (2002) Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants. *Nature* 415:451–454
- Höll W (1974) Dark CO<sub>2</sub> fixation by cell-free preparations of the wood of *Robinia pseudoacacia*. *Can J Bot* 52:727–734
- Langenfeld-Heyser R (1989) CO<sub>2</sub> fixation in stem slices of *Picea abies* (L.) Karst: microautoradiographic studies. *Trees Struct Funct* 3:24–32
- Lasa B, Frechilla S, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C (2002) Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiol Biochem* 40:969–976
- McGuire MA, Teskey RO (2002) Microelectrode technique for in situ measurement of carbon dioxide concentrations in xylem sap of trees. *Tree Physiol* 22:807–811
- Nilsen ET (1995) Stem photosynthesis: extent, patterns, and role in plant carbon economy. In: Gartner B (ed) *Stems and trunks in plant form and function*. Academic Press, San Diego, pp 223–240
- Pfanz H, Aschan G (2001) The existence of bark and stem photosynthesis in woody plants and its significance for the overall carbon gain. An eco-physiological and ecological approach. In: *Prog. Bot.* Springer, Berlin, pp 478–510
- Pfanz H, Aschan G, Langenfeld-Heyser R, Wittmann C, Loose M (2002) Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* 89:147–162
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1986) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975:384–394
- Rosendahl L, Vance CP, Pedersen WB (1990) Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol* 93:12–19
- Schaedle M, Brayman A (1986) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity of *Populus tremuloides* Michx. bark tissues. *Tree Physiol* 1:53–56
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339–346
- Sun Q, Yoda K, Suzuki M, Suzuki H (2003) Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *J Exp Bot* 54:1627–1635
- Tietz S, Wild A (1991) Investigations on the phosphoenolpyruvate carboxylase activity of spruce needles relative to the occurrence of novel forest decline. *J Plant Physiol* 137:327–331
- Uedan K, Sugiyama T (1976) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol* 57:906–910
- Van Cleve B, Forreiter C; Sauer JJ, Apel K (1993) Pith cells of poplar contains photosynthetically active chloroplasts. *Planta* 189:70–73
- Von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376–387
- Wittmann C, Pfanz H, Loreto F, Centritto M, Pietrini F, Alessio G (2006) Stem CO<sub>2</sub> release under illumination: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant Cell Environ* 29:1149–1158



***IV) LA PEPC DES TIGES DE  
L'ARBRE : UNE IMPLICATION  
POSSIBLE DANS UN  
METABOLISME C<sub>4</sub> ?***

---

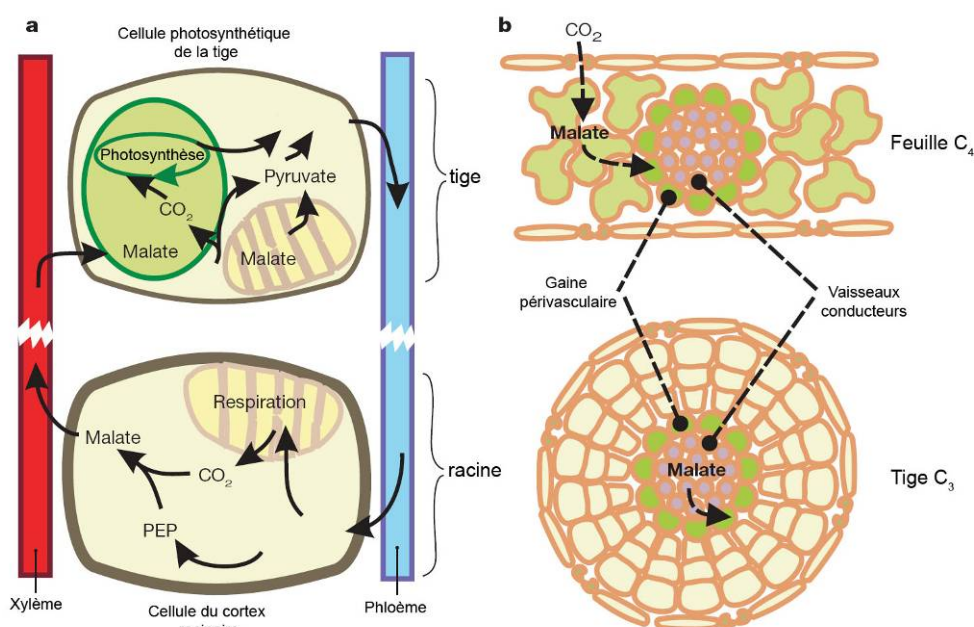




## PRESENTATION

L'étude présentée dans le **chapitre III** a révélé, pour la première fois, de fortes activités PEPC dans les tiges d'espèces ligneuses. Depuis quelques années, de nombreux auteurs soupçonnaient l'implication de cette enzyme dans l'assimilation de carbone par la tige. Plusieurs hypothèses furent proposées pour expliquer le rôle de la PEPC dans le métabolisme carboné de la tige.

Puisque la Rubisco est présente également dans la tige, l'hypothèse la plus répandue était qu'un métabolisme de type C<sub>4</sub> (**annexe 3**) puisse avoir lieu dans la tige des espèces ligneuses, plantes à métabolisme C<sub>3</sub>. Cette hypothèse s'appuie principalement sur l'étude d'Hibberd & Quick (2002). Cette étude a révélé notamment des activités importantes d'enzymes décarboxylantes typiques de plantes à métabolisme C<sub>4</sub> (NADP ME, NAD-ME et PEPC) et la présence de cellules chlorophylliennes dans les tissus répartis autour des vaisseaux des tiges et pétioles de tabac, plante à métabolisme C<sub>3</sub>. En fournissant du <sup>14</sup>C-NaHCO<sub>3</sub> ou de <sup>14</sup>C-glucose au niveau des racines, ils ont découvert peu après que le marquage avait intégré la matière organique insoluble (notamment l'amidon) des tiges et des pétioles de la plante. Les auteurs ont suggéré que ces tissus pouvaient présenter un métabolisme de type C<sub>4</sub> avec l'utilisation de CO<sub>2</sub> dissout dans le xylème ou provenant du malate, préalablement synthétiser au niveau des racines via une PEPC puis décarboxylé ensuite au niveau des tiges (**figure 19**).



**Figure 19** : (a) l'hypothèse d'Hibberd & Quick suppose qu'une PEPC fixe le CO<sub>2</sub> au niveau des racines, en formant du malate, et que ce malate est ensuite transporté par le flux xylémien au niveau des feuilles afin d'y être décarboxylé (via la NADP-ME, NAD-ME et PEPC). A partir du pyruvate, le PEP est régénéré par des la PPDK au niveau des tiges puis renvoyé dans la racine via le phloème. (b) Analogies probables entre une feuille d'une plante à métabolisme C<sub>4</sub> et la tige de tabac, plante à métabolisme C<sub>3</sub>. D'après Hibberd & Quick (2002).

Si le même équipement enzymatique découvert chez le tabac est présent chez la tige, un métabolisme de type C<sub>4</sub> peut alors avoir lieu. Nous avons déjà vu dans le **chapitre II** que la PEPC est présente à de forts niveaux d'activité et que les rapports d'activité PEPC/Rubisco sont intermédiaires entre ceux des métabolismes C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>. Mais un métabolisme de type C<sub>4</sub> nécessite également que les processus d'assimilation de CO<sub>2</sub> impliquant d'abord la PEPC puis ensuite la Rubisco soient séparés dans l'espace (**annexe 3**). De plus, la PEPC des plantes C<sub>4</sub> présente des particularités biochimiques différentes de celles de la PEPC des plantes à métabolisme C<sub>3</sub>, notamment au niveau de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, le PEP, et sa sensibilité aux différents effecteurs comme le glucose-6-phosphate et le malate.



Afin de vérifier s'il y a ou non un métabolisme de type C<sub>4</sub> chez les tiges ligneuses, nous avons travaillé sur les caractéristiques biochimiques de la PEPC afin de les comparer à celles de la PEPC des plantes à métabolisme C<sub>4</sub>. Par immunocytochimie, nous avons également localisé la Rubisco et la PEPC sur des coupes de tiges. Nous avons choisi de travailler sur les jeunes tiges de l'année de hêtre prélevées peu après le débourrement (**figure 20**) car c'est à cette période que la tige présente la plus forte activité photosynthétique (voir **chapitre II**).

Cette étude a fait l'objet d'une collaboration étroite avec le groupe "Signalisation et régulation métabolique" de l'Institut de Biotechnologie des Plantes (Jean Vidal, IBP, Orsay) et le Centre Commun de Microscopie Electronique (Jeril Degrouard, CCME, Orsay).

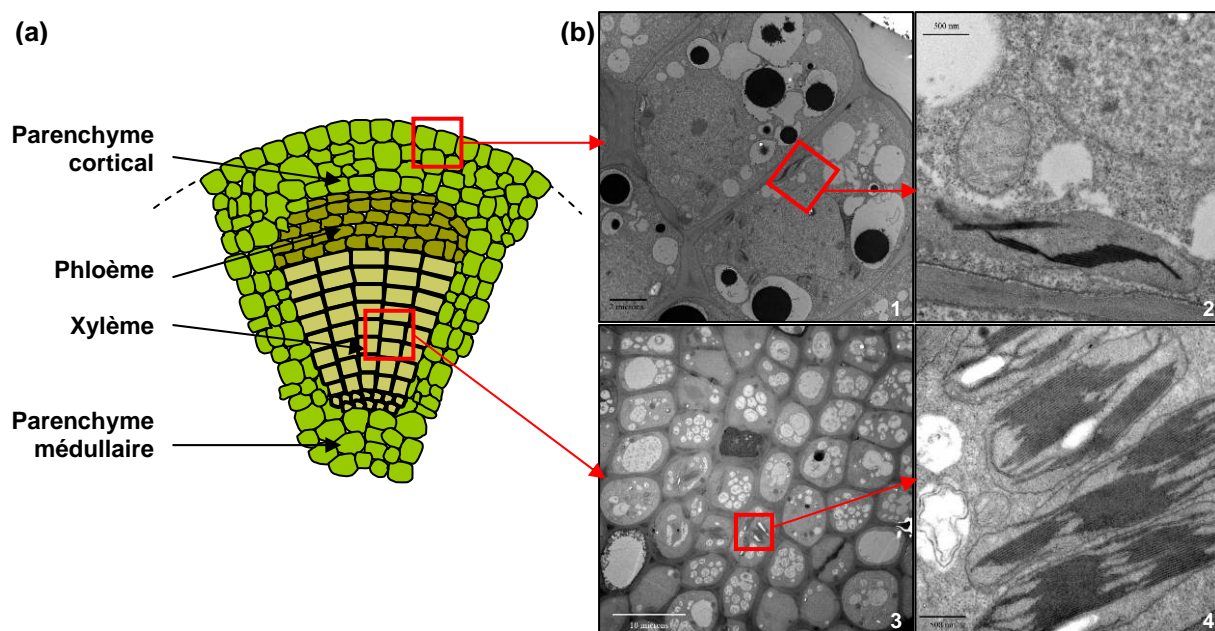


**Figure 20** : Proxyphotographie d'une jeune tige de l'année de hêtre prélevée peu de temps après le débourrement (fin avril). Barre d'échelle = 1 cm.

### ASPECTS TECHNIQUES

Cette étude fût l'une des toutes premières à étudier la PEPC dans les tiges. Les techniques de microscopie électronique et de Western Blot ont nécessité plusieurs séances de mise au point pour adapter les protocoles connus au matériel végétal.

La préparation des échantillons en vue de l'observation au microscope électronique à transmission (MET) fût l'une des étapes la plus longue de ce travail. En effet, il existe peu d'études ayant traité cet aspect sur les tiges ligneuses. Il a été nécessaire d'ajuster les protocoles connus pour une bonne préparation des échantillons de tige (**annexe 4**). La fixation chimique a nécessité le passage des échantillons plusieurs fois sous vide afin d'éliminer le maximum de bulles et de permettre une meilleure pénétration du fixateur dans le tissu. Les temps dans les bains d'éthanol ainsi que le nombre de bains ont été augmentés afin d'assurer une bonne déshydratation des tissus. Ces mises au point ont été faites sur du matériel ayant une structure proche de celle qu'aurait la tige peu après le débourrement. Nous avons choisi de faire les tests sur les minuscules tiges présentes dans les bourgeons de hêtre.



**Figure 21** : (a) représentation schématique d'une section de tige de bourgeon de hêtre avec un faisceau criblo-vasculaire défini par le phloème et le xylème et (b) électrographies de cellules de l'épiderme de cette tige. Barres d'échelles : (1) 2  $\mu$ m, (2) 500 nm, (3) 10  $\mu$ m et (4) 500 nm.

Les images obtenues à partir de ces mises au point nous ont permis de **valider le protocole de préparation des échantillons de tige pour la microscopie électronique**. Les images ont révélé une variabilité de la densité de granas chloroplastiques dans les tiges des bourgeons de hêtre. Les cellules périphériques présentaient des chloroplastes quasi agranaires alors que les chloroplastes des cellules du xylème possédaient beaucoup plus de grana (**figure 21**). Chez les plantes à métabolisme C<sub>4</sub>, les chloroplastes des cellules du mésophylle possèdent beaucoup de grana et peu ou pas de grains d'amidon alors que les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire sont plus gros, agranaires et ont de nombreux grains d'amidon.

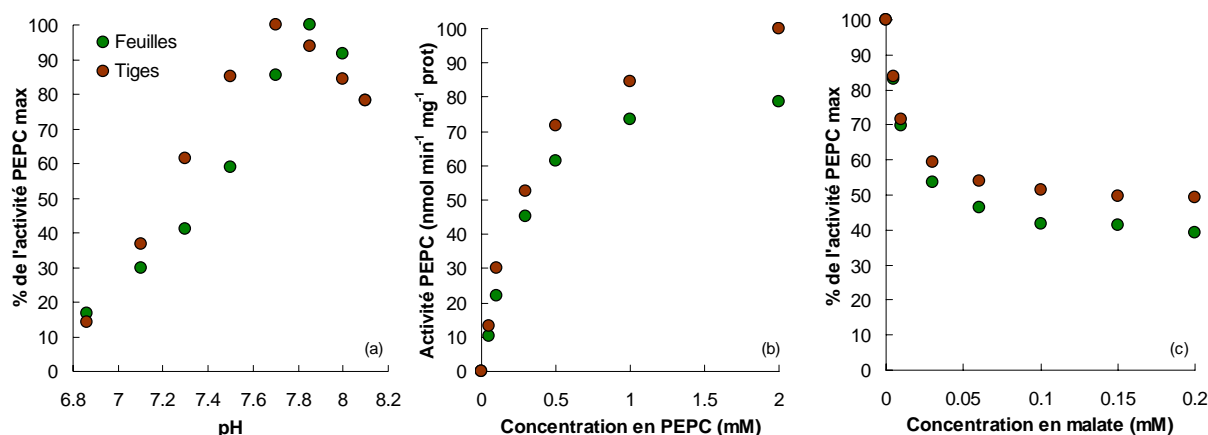
Concernant les manipulations de Western Blot (protocole en **annexe 5**), la mise au point était centrée sur l'extraction et la purification des protéines solubles totales. La technique employée à l'IBP se déroulait en trois phases : (1) extraction "classique" comprenant notamment du tampon HEPES, du dithiothreitol (DTT) et du MgCl<sub>2</sub>, (2) précipitation des protéines solubles au sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (3) filtration sur colonne de dessalage (Sephadex G25) pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel pouvant interférer avec le Western Blot.

L'ajout de polyéthylène glycol (PEG 4000) fût indispensable à la bonne extraction de la PEPC des tiges. Ce composé est utilisé comme agent mouillant notamment pour préserver les protéines extraites de l'oxydation par les poly phénols et tannins présents dans les feuilles et tiges des arbres. Mais à concentration habituellement utilisée dans l'extraction des protéines de la tige (7 à 10 %), le PEG interférait avec le sulfate d'ammonium empêchant la précipitation des protéines. Il s'est avéré que le problème était résolu pour une concentration de PEG de 3 % (m/m).

## PRINCIPAUX RESULTATS

Les protocoles de préparation des échantillons de tige du bourgeon (**annexe 4**) ont donné de bons résultats sur les jeunes tiges de hêtre prélevées peu après le débourrement (**figure 20**). Contrairement aux observations faites sur la tige du bourgeon, la densité de grana est faible quel que soit le tissu observé ce qui est caractéristique d'une adaptation des chloroplastes à l'obscurité. Les chloroplastes des cellules des parenchymes (cortical et médullaire) de la tige étudiée (après le débourrement) contiennent de gros grains d'amidon indiquant **une activité photosynthétique**.

Les caractéristiques biochimiques de la PEPC ont été suivies sur les tiges et feuilles. Il s'agissait de mesurer l'activité de l'enzyme, de déterminer sa masse moléculaire (voir protocole Western Blot en **annexe 5**), sa sensibilité au pH, son K<sub>m</sub> apparent et sa cinétique de réponse au malate (IC<sub>50</sub>), un inhibiteur compétitif (**figure 22**).



**Figure 22** : exemples de cinétiques de l'activité PEPC permettant le calcul de son pH optimum (a), du K<sub>m</sub> PEP (b) et de l'IC<sub>50</sub> malate (c).

Comme dans l'étude précédente (**chapitre II**), nous montrons que l'**activité PEPC est plus importante dans les tiges que dans les feuilles** et que les rapports des activités PEPC/Rubisco sont supérieurs à ce qui est rencontré classiquement chez les plantes en C<sub>3</sub>. Que ce soit dans la tige ou dans la feuille de hêtre, les **caractéristiques biochimiques de la PEPC sont similaires à celles d'une PEPC de plante C<sub>3</sub>** :  $K_m$  apparent = 0.3 mM (2.5 chez une plante C<sub>4</sub>) et  $IC_{50}$  = 0.10 mM (1.0 chez une plante C<sub>4</sub>). L'analyse SDS-PAGE précédant la détection par immunoblot a révélé des **profils protéiques similaires entre feuille et tige de hêtre**, avec une Rubisco plus abondante dans la feuille, ce qui est en accord avec les résultats d'activités Rubisco publiés auparavant (**chapitre III**).

Le métabolisme C<sub>4</sub> est caractérisé par une séparation spatiale des processus de fixation du carbone et de capture de la lumière. Le cas le plus répandu correspond à une séparation tissulaire du processus de concentration du CO<sub>2</sub>, ayant lieu dans les cellules du mésophylle et impliquant la PEPC, et du processus photochimique, ayant lieu dans les cellules de la gaine périvasculaire (anatomie Kranz) et impliquant la Rubisco. Il existe également la possibilité d'une séparation intracellulaire des deux processus cités ci-dessus. La cellule montre alors une polarité dans la densité des chloroplastes et dans les deux processus du métabolisme C<sub>4</sub> : la partie proximale de la cellule contient beaucoup de chloroplaste où la Rubisco y est préférentiellement localisée. Ce type de séparation spatiale a été récemment découvert chez *Borszczowia aralocaspica*, plante de désert asiatique (Voznesenskaya *et al.*, 2001), et *Hydrilla verticillata*, plante aquatique (Magnin *et al.*, 1997).

Concernant les tiges de hêtre, c'est la première fois qu'une étude montre une co-localisation de la PEPC et de la Rubisco sur cet organe. Bien qu'une quantité plus importante de Rubisco ait pu être observée dans les cellules du xylème, les enzymes PEPC et Rubisco dans la tige ne montrent **pas de distribution préférentielle**, que ce soit entre les différents types cellulaires observés (parenchyme cortical, xylème, parenchyme médullaire) ou au sein même des cellules.

L'absence de séparation spatiale des enzymes PEPC et Rubisco et les caractéristiques de la PEPC des tiges suggèrent donc qu'un **métabolisme de type C<sub>4</sub> n'a pas lieu dans les tiges de hêtre**.

**ARTICLE :**

**TREE STEM PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (PEPC): LACK OF BIOCHEMICAL AND LOCALIZATION EVIDENCE FOR A C<sub>4</sub>-LIKE PHOTOSYNTHESIS SYSTEM**

BERVEILLER Daniel, VIDAL Jean, DEGROUARD Jeril, AMBARD-BRETTEVILLE Françoise, PIERRE Jean-Noël, JAILLARD Danielle & DAMESIN Claire

*New Phytologist*, **176**: 775-781

Décembre 2007



## Rapid report

# Tree stem phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC): lack of biochemical and localization evidence for a C<sub>4</sub>-like photosynthesis system

Author for correspondence:  
Daniel Berveiller  
Tel: +33 1 69 15 64 27  
Fax: +33 1 69 15 72 38  
Email: [daniel.berveiller@u-psud.fr](mailto:daniel.berveiller@u-psud.fr)

Received: 10 August 2007  
Accepted: 20 September 2007

Daniel Berveiller<sup>1</sup>, Jean Vidal<sup>2</sup>, Jeril Degrouard<sup>3</sup>,  
Françoise Ambard-Bretteville<sup>2</sup>, Jean-Noël Pierre<sup>2</sup>, Danielle Jaillard<sup>3</sup> and  
Claire Damesin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR8079, Orsay, F-91405; University Paris-Sud, Orsay, F-91405; AgroParisTech, Paris, F-75231, France; <sup>2</sup>CNRS, Institut de Biotechnologie des Plantes, UMR8618, Orsay, F-91405; University Paris-Sud, Orsay, F-91405, France; <sup>3</sup>CNRS, Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR8080, Orsay, F-91405; University Paris-Sud, Orsay, F-91405, France

**Key words:** beech (*Fagus sylvatica*), immunogold labelling, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), stem photosynthesis.

### Summary

- Here, the kinetic properties and immunolocalization of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in young stems of *Fagus sylvatica* were investigated. The aim of the study was to test the hypothesis that there is a C<sub>4</sub>-like photosynthesis system in the stems of this C<sub>3</sub> tree species.
- The activity, optimal pH and L-malate sensitivity of PEPC, and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for phosphoenolpyruvate (PEP), were measured in protein extracts from current-year stems and leaves. A gel blot experiment and immunolocalization studies were performed to examine the isozyme complexity of PEPC and the tissue distribution of PEPC and Rubisco in stems.
- Leaf and stem PEPCs exhibited similar, classical values characteristic of C<sub>3</sub> PEPCs, with an optimal pH of c. 7.8, a  $K_m$  for PEP of c. 0.3 mM and a  $IC_{50}$  for L-malate (the L-malate concentration that inhibits 50% of PEPC activity at the  $K_m$  for PEP) of c. 0.1 mM. Western blot analysis showed the presence of two PEPC subunits (molecular mass c. 110 kDa) both in leaves and in stems. Immunogold labelling did not reveal any differential localization of PEPC and Rubisco, neither between nor inside cells.
- This study suggests that C<sub>4</sub>-type photosynthesis does not occur in stems of *F. sylvatica* and underlines the importance of PEPC in nonphotosynthetic carbon fixation by most stem tissues (fixation of respired CO<sub>2</sub> and fixation via the anaerobic pathway).

*New Phytologist* (2007) **176**: 775–781

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)  
doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02283.x

## Introduction

In forest ecosystems, carbon (C) fluxes include plant respiration and photosynthesis. Although leaf photosynthesis represents the major part of the C assimilated by the plant, it is known that flowers, fruits and stems are able to photosynthesize (Aschan & Pfanz, 2003, 2006; Aschan *et al.*, 2005). We showed that current-year stems of European beech (*Fagus sylvatica*) are able to assimilate the equivalent of 40% of the C lost by respiration over a whole season (Damesin, 2003). Stem photosynthesis has been shown to be active in various tree species, with some of them exhibiting an instantaneous positive net CO<sub>2</sub> assimilation (Berveiller *et al.*, 2007).

The major source of assimilated C in stems is thought to be respiration (Nilsen, 1995; Cernusak & Marshall, 2000; Pfanz *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2005, 2006). Because of the high CO<sub>2</sub> concentration inside stems and their low permeability to gaseous diffusion (Pfanz *et al.*, 2002), very little external CO<sub>2</sub> reaches the chlorenchyma. CO<sub>2</sub> fixation in stems certainly occurs through ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in the Calvin–Benson cycle. Rubisco activity was detected for the first time in bark tissues of *Populus tremuloides* by Schaedle & Brayman (1986), and we recently showed that young beech stems exhibit Rubisco activity, which remains nearly constant over the whole season (except just after budburst, when it is highest) (Berveiller & Damesin, in press). However, it has been proposed that phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) can play a role in the regulation of CO<sub>2</sub> concentration and cytosolic pH by capturing part of the CO<sub>2</sub> (in its hydrated form) respired by stems. Höll (1973, 1974) was the first to report PEPC activity in wood of *Robinia pseudoacacia*. More recently, PEPC was detected in the bark chlorenchyma of *Pinus sylvestris* (Ivanov *et al.*, 2006) and in the whole stems of various tree species (Berveiller & Damesin, in press).

Some reports have recently proposed the possibility of a C<sub>4</sub>-type pathway occurring in tree stems (Damesin, 2003; Ivanov *et al.*, 2006; Wittmann *et al.*, 2006; Berveiller & Damesin, in press). This concept is based on the paper by Hibberd & Quick (2002), which showed that photosynthetic cells of tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems and petioles surrounding xylem and phloem possess high activities of enzymes characteristic of C<sub>4</sub> photosynthesis, especially the decarboxylating enzymes. These enzymes (NAD- and NADP-ME) allow the rapid decarboxylation of four-carbon organic acids, for example malate, fed from the xylem and phloem, thus releasing CO<sub>2</sub> for photosynthesis. This system suggests that this C<sub>4</sub> metabolite is synthesized via root PEPC activity, thus fulfilling the criterion of spatial separation of carboxylation activities (e.g. PEPC and Rubisco) characteristic of C<sub>4</sub> plants. If such tissues surrounding the vessels have in tree stems the same enzymatic equipment as in tobacco stems, a similar C<sub>4</sub>-like photosynthesis system may be present. However, tree stems have relatively high PEPC:Rubisco activity ratios (10 for a C<sub>4</sub>-plant leaf, 1 for a

C<sub>3</sub>-plant leaf, and 3 in tree stems; Berveiller & Damesin, in press) such that the classical C<sub>4</sub> photosynthesis system may also operate in the concentrically organized tissues of tree stems. This suggests a partial, or total, separation of PEPC- from Rubisco-containing cells. To the best of our knowledge, trees do not have a C<sub>4</sub> PEPC-encoding gene, but such a system may use a C<sub>3</sub>-type PEPC, provided that its activity is high enough to sustain the C flux required by the pathway. In the present work, these questions have been addressed by investigating the biochemical properties and localization of PEPC (with respect to those of Rubisco) in stems of *Fagus sylvatica*.

## Materials and Methods

### Plant material

Samples of leaves and current-year stems of *Fagus sylvatica* L. (Fig. 1a) were obtained at the end of April 2006 from three adult trees at the University campus (University Paris-Sud, Orsay, France). Sampling was performed (at midday on the light-exposed part of the trees from the outer crown, at a height of *c.* 2–4 m, with a pruning hook) a few days after budburst; at this stage, young stems contained maximal amounts of soluble protein and showed high PEPC activity (Berveiller & Damesin, in press). Except in the case of chemical fixation, all the samples were immediately immersed in liquid nitrogen and stored at –80°C until use.

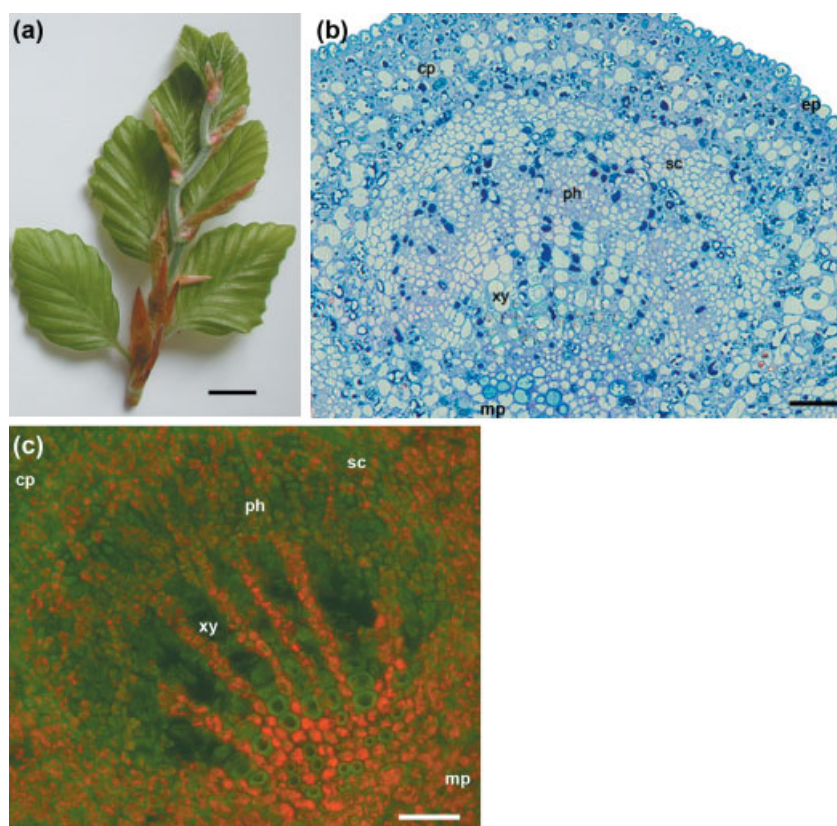
### Protein extraction and enzyme assays

Frozen material (300 mg) was powdered under liquid nitrogen and ground in a buffer, as described in Gousset-Dupont *et al.* (2005). The addition of 3% (weight/weight (w/w)) polyethylene glycol (PEG) 4000 to the extraction medium was found to be required for maximal recovery of PEPC activity. Enzyme assays and the determination of the kinetic properties of PEPC were performed as described in Echevarria *et al.* (1994). The substrate (PEP) and L-malate response curves were determined at optimal (7.8) and suboptimal pH (7.3), respectively, to allow calculation of the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for PEP (PEP concentration for 50% of maximal PEPC activity) and the IC<sub>50</sub> for L-malate (the L-malate concentration that inhibits 50% of PEPC activity at the  $K_m$  for PEP). Total soluble protein contents were determined by the technique of Bradford (1976), with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### Gel blot experiment

Aliquots (50 µg of proteins) of leaf and stem extracts were subjected to sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 8% acrylamide) (Laemmli, 1970) and immunoblot experiments were performed as described in Giglioli-Guivarc'h *et al.* (1996) using anti-C- and anti-N-terminal peptide antibodies and a chemiluminescent assay





**Fig. 1** Proxy photograph of a *Fagus sylvatica* leafy stem sampled at the end of April (a), and a semithin section of stem observed under a brightfield (b) and an epifluorescence (c) microscope. Bar: (a) 1 cm; (b, c) 50  $\mu\text{m}$ . cp, cortical parenchyma; ep, epidermis; mp, medullary parenchyma; ph, phloem; sc, sclerenchyma; xy, xylem.

(Supersignal West Dura Signal; Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Sample preparation for light and electron microscopy

For epifluorescence observations, a transverse section (0.5 mm thick) of current-year stem was observed under an epifluorescence microscope (Axiophot; Zeiss, Rödermark, Germany) equipped with a blue excitation filter (BP 450–490) and an emission filter (LT 520). For brightfield and ultrastructure observations, small pieces of middle and apical portions of the stems were fixed in 3% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 100 mM cacodylate buffer (pH 7.3) in the presence of 1% (weight/volume (w/v)) tannic acid, 2% (w/v) sucrose, 0.1% Brij-35, and 2 mM  $\text{CaCl}_2$  at room temperature for 6 h. It was necessary to place the mixture (fixer plus samples) in a vacuum for a few minutes (three times) to thoroughly impregnate the samples with the fixer. The samples were then washed with the cacodylate buffer and postfixed in 2%  $\text{OsO}_4$  in cacodylate buffer for 1.5 h. They were then dehydrated through an ethanol series (10–95%) and embedded in Spurr's resin (Spurr, 1969). Transverse semithin sections (700 nm thick) of stem pieces were mounted on slides, stained with solution (Azure II 1% in water + methylene blue 1% in 1% borax) and observed under a standard upright microscope (BX 40; Olympus, Tokyo, Japan). For electron microscopy, transverse ultrathin sections (60 nm thick) of stem pieces were mounted

on copper grids coated with Formvar (Monsanto Co., St Louis, MO, USA; polyvinylformal) and C, stained in uranyl acetate and lead citrate, and viewed under a transmission electron microscope (EM 300; Philips, Amsterdam, the Netherlands).

### Immunogold labelling

Small stem samples were fixed in 0.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde (in the same buffer described above), dehydrated through an ethanol series and embedded in LRWhite resin (London Resin Co., Reading, UK). Ultrathin sections (60 nm thick) were collected on nickel grids coated with Formvar and C. The antisera used for immunogold labelling were anti-sorghum leaf  $\text{C}_4$  PEPC antiserum and anti-maize leaf Rubisco large-subunit (LS) antiserum. They were used at a dilution of 1 : 1000 for Rubisco and 1 : 2000 for PEPC. The sections were stained with uranyl acetate. Some grids were coated with a preimmune serum as a control. The density of labelling was determined by counting the gold particles on several electron micrographs ( $8 \leq n \leq 15$ ) and by calculating the number per unit area ( $\mu\text{m}^2$ ).

## Results and Discussion

### Anatomy of young current-year stems

A few days after budburst, young stems of European beech were found to be wholly green (Fig. 1a) and phloem, xylem



**Table 1** Kinetic and regulatory properties of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from leaves and current-year stems of *Fagus sylvatica*

	Optimal pH	PEPC activity at optimal pH (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)	PEPC activity at pH 7.3 (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)	PEP $K_m$ (mM)	L-malate IC <sub>50</sub> (mM)
Leaves	7.8	89.7 ± 4.4 (3)	48.5 ± 5.0 (6)	0.25 ± 0.08 (5)	0.07 ± 0.04 (4)
Stems	7.7	124.5 ± 15.4 (4) ns	62.6 ± 4.1 (5) ns	0.29 ± 0.07 (5) ns	0.11 ± 0.06 (4) ns

Values are mean ± SD (*n*). Data for stems and leaves were compared using a Student's *t*-test ( $P = 0.05$ ).

PEP  $K_m$ , Michaelis-Menten constant, PEP concentration for 50% of maximal PEPC activity; L-malate IC<sub>50</sub>, the L-malate concentration that inhibits 50% of PEPC activity at the  $K_m$  for PEP; ns, not significant.

and sclerenchyma were well developed (Fig. 1b). At this growth stage, the epidermis consisted of a single cell layer and the stem exhibited chlorophyll (Fig. 1c) and chloroplasts (Fig. 2a,b,c) in all cell types. In both cortical and medullar parenchyma, numerous chloroplasts could be seen, in contrast to the xylem, which contained numerous vessels (i.e. dead cells). These results are in good agreement with previous observations on the distribution of chlorophyll in the stem by epifluorescence microscopy (Dima *et al.*, 2006; Levizou & Manetas, 2006; Pilarski & Tokarz, 2006; Wittmann *et al.*, 2006; Berveiller *et al.*, 2007; Berveiller & Damesin, in press). In all tissues, the chloroplasts contained few grana stacks, which is a characteristic feature of light-adapted chloroplasts (Boardman, 1977). In contrast to our observations on buds and older stems (data not shown), there was no apparent gradient of grana stacks from the epidermis to the medullar parenchyma. On the basis of the presence of grana stacks and large starch grains, especially in parenchyma cells (Fig. 2a,c), the chloroplasts seemed to be photosynthetically functional.

### Stem PEPC characteristics

We determined some biochemical properties of stem and leaf PEPCs. The leaf enzyme is a typical C<sub>3</sub>-type PEPC known to be involved in the replenishment of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates to sustain amino acid synthesis via the anaplerotic pathway (Latzko & Kelly, 1983; Lepiniec *et al.*, 1994; Stitt *et al.*, 2002).

SDS-PAGE analysis (Fig. 3a) showed very similar protein profiles for leaves and current-year stems, with the large subunit of Rubisco (*c.* 55 kDa) being the quantitatively predominant protein of the extracts. It was also noted that Rubisco was less abundant in stems than in leaves, in accordance with Rubisco activity measurements (Berveiller & Damesin, in press). Western blot analysis using C- and N-terminal PEPC antibodies as probes (Fig. 2b) revealed two PEPC bands with similar intensities (*c.* 110-kDa), which should correspond to different isoforms (as the subunits are intact proteins). Indeed, C<sub>3</sub> plants possess several genes encoding PEPC (classically four) which are differently expressed according to the organ (Svensson *et al.*, 2003; Gousset-Dupont *et al.*, 2005; Lebouteiller *et al.*, 2007).

The optimal pH for the enzyme was 7.8 and 7.7 in leaf and current-year stem extracts, respectively (Table 1). On a pro-

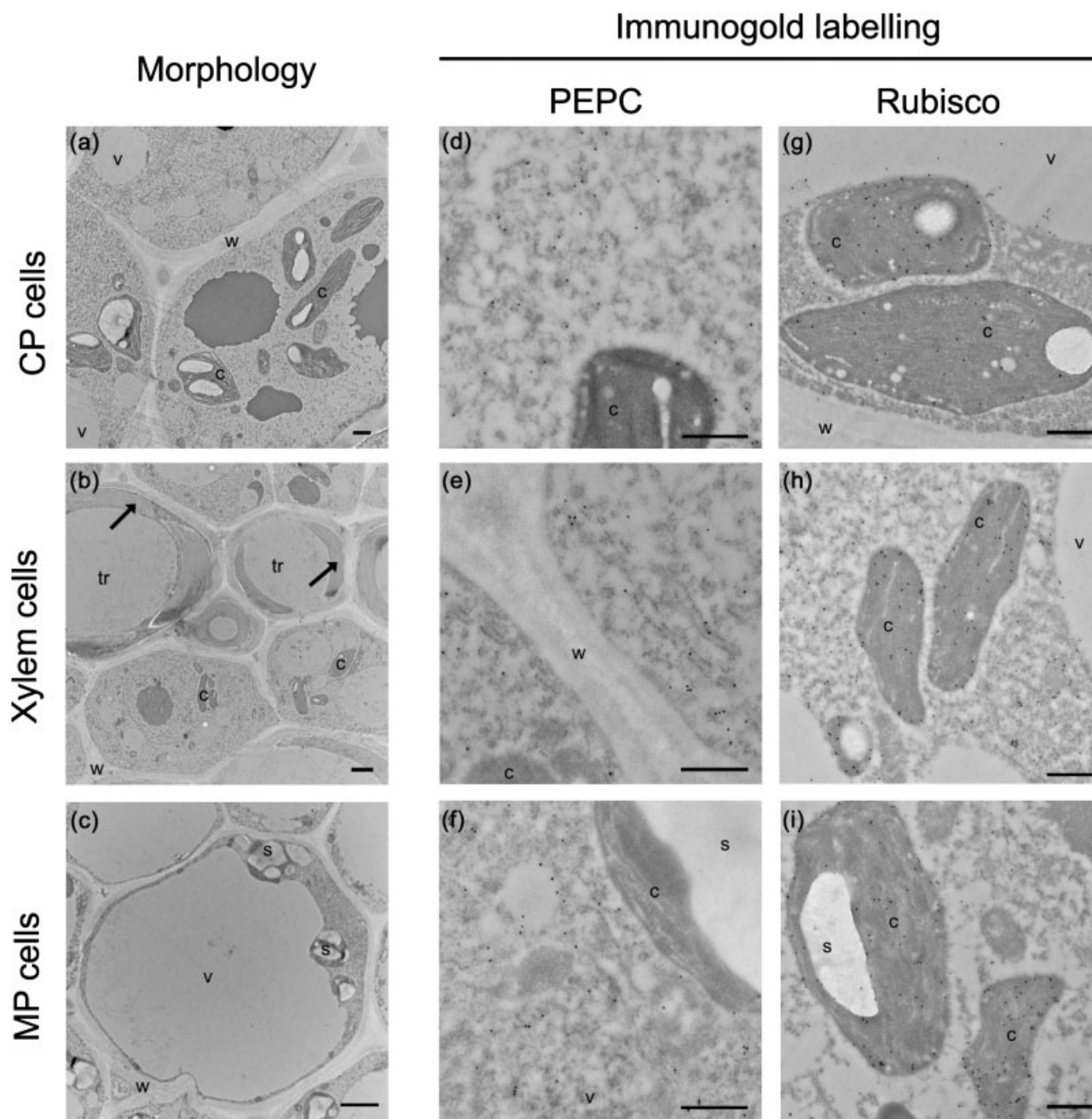
tein basis, the PEPC activity was 1.3-fold higher in current-year stems than in leaves (the difference was nonsignificant), when measured at both the optimal pH and at pH 7.3. The activity ratio (pH 7.8 : 7.3) generally reflects the phosphorylation state of the enzyme; that is, the ratio decreases when the phosphorylation state increases (Echevarria *et al.*, 1994). It was found to be 1.9 and 2.0 for leaves and stems, respectively, suggesting that the enzyme has a similar phosphorylation state in the two organs (at the stage of harvest).

Substrate response curves (PEP) were hyperbolic in shape, with similar  $K_m$  values of 0.25 and 0.29 mM for leaves and stems, respectively (Table 1), which are close to values characteristic of a C<sub>3</sub>-type PEPC; C<sub>4</sub>-type enzymes have  $K_m$  values of *c.* 2.5 mM (O'leary, 1982). The L-malate IC<sub>50</sub> values were also typical of C<sub>3</sub> plant PEPCs and 10-fold lower than those displayed by C<sub>4</sub> plant PEPCs (O'leary, 1982). Taken together, these results show that the current-year stem PEPC exhibits the typical kinetic properties of a C<sub>3</sub> plant enzyme, with no large increase in content (as compared with leaves). This is not indicative of the occurrence of a C<sub>4</sub>-like system in this organ.

### Localization of Rubisco and PEPC in stem tissues

C<sub>4</sub> plants are classically characterized by a spatial separation of the photosynthetic pathway in two structurally and biochemically specialized photosynthetic cell types (Kranz anatomy). In addition, recent results have shown that C<sub>4</sub>-like photosynthesis may occur in single cells of C<sub>3</sub> plants, for example *Hydrilla verticillata* (Magnin *et al.*, 1997) and *Borszczowia aralocaspica* (Voznesenskaya *et al.*, 2001); in *H. verticillata*, an aquatic plant, the C<sub>4</sub> system is inducible, while in *B. aralocaspica* there occurs a polarity in specialized chloroplasts. In stems of *F. sylvatica*, we have reported a relatively high PEPC:Rubisco activity ratio (Berveiller & Damesin, in press). This prompted us to examine whether the two carboxylases are totally or partially separated in the concentrically organized cells of tree stems, such that a C<sub>4</sub>-like photosynthesis system could be operative in this organ, in addition to the system proposed by Hibberd & Quick (2002).

In current-year stems of *F. sylvatica*, Rubisco and PEPC were detected in all investigated tissues (Fig. 3d–i). Until now, the only study considering this aspect of tree stem photosynthesis was that by Buns *et al.* (1993). These authors detected



**Fig. 2** Ultrastructural anatomy of current-year stems of *Fagus sylvatica* (a, b, c) and immunogold labelling of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) (d, e, f) and the Rubisco large subunit (g, h, i) in these stems. (b) Arrows indicate the secondary wall in the process of formation during tracheid development. c, chloroplast; CP, cortical parenchyma; MP, medullary parenchyma; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; s, starch; tr, tracheid; v, vacuole; w, wall. Bars: (a, c) 2  $\mu$ m; (b) 5  $\mu$ m; (d–i) 0.5  $\mu$ m.

a low density of Rubisco labelling in twigs of *Taxus baccata* in comparison to needles. Similarly, our results showed a low density of Rubisco and PEPC labelling (Table 2). The high labelling detected in the cytosol in the case of PEPC (a cytosolic enzyme), and in chloroplasts in the case of Rubisco LS, together with a low background (statistically different from PEPC and Rubisco labelling and close to that of the pre-immune serum; data not shown), showed that the technique

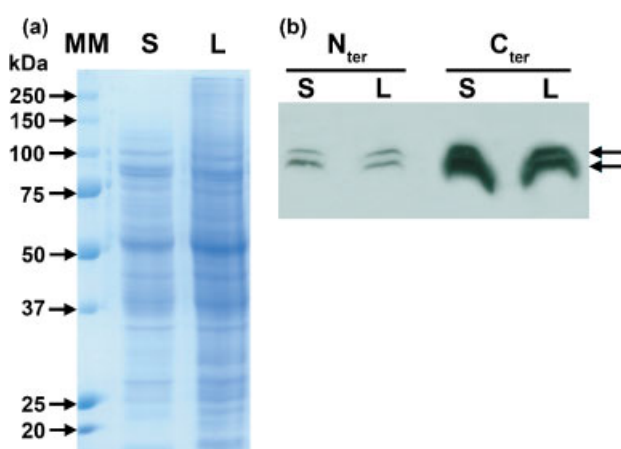
is valid and particularly well adapted to this material. It appeared that the chloroplasts accumulated significantly more Rubisco (approximately twice as much) in xylem cells than in cortical or medullary parenchyma cells. This observation supports the Hibberd and Quick hypothesis as it suggests a functional link between these cells and xylem vessels. The vessels provide CO<sub>2</sub> (probably via malate and corresponding decarboxylating enzymes) to xylem cells, thereby elevating its concentration in

**Table 2** Immunogold labelling of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in the different cell types of current-year stems of *Fagus sylvatica*

	Cell fraction	Number of gold particles per $\mu\text{m}^2$		
		CP cells	Xylem cells	MP cells
PEPC	Cytosol	$7.2 \pm 0.7$ (14) <sup>a</sup>	$7.1 \pm 0.6$ (13) <sup>a</sup>	$6.4 \pm 0.4$ (8) <sup>a</sup>
	Organelles	$2.4 \pm 0.6$ (14)	$1.3 \pm 0.2$ (13)	$1.0 \pm 0.2$ (8)
Rubisco LS	Chloroplasts (starch grains omitted)	$16.8 \pm 2.4$ (10) <sup>a</sup>	$31.5 \pm 3.1$ (15) <sup>b</sup>	$19.6 \pm 1.5$ (14) <sup>a</sup>
	Cytosol + other organelles	$3.5 \pm 0.5$ (10)	$6.0 \pm 1.3$ (15)	$3.5 \pm 0.4$ (14)

The number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  is given as mean  $\pm$  SD (*n*). Within the same row, a different superscript letter indicates a significant difference at  $P < 0.05$  (Student's *t*-test).

CP, cortical parenchyma; MP, medullary parenchyma; Rubisco LS, Rubisco large subunit.



**Fig. 3** Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 8% acrylamide) of total soluble protein (a), and western blot analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) with anti-N-terminal ( $N_{\text{ter}}$ ) and anti-C-terminal ( $C_{\text{ter}}$ ) antibodies (b) from leaves (L) and current-year stems (S) of *Fagus sylvatica*. (b) Arrows indicate the two PEPC isoforms. MM, molecular mass markers.

the vicinity of Rubisco. This hypothesis may be supported further by the presence of light in vascular tissues of tree stems (Sun *et al.*, 2003). However, the uniform localization of PEPC in all tissues, the absence of a preferential distribution of chloroplasts in cells, and the PEPC kinetic data suggest that a  $C_4$ -like system based on the separation of carboxylating enzymes, or on the single cell system (as described in *B. aralocaspica*), is not operative in stems. The current dogma is that Rubisco refixes  $\text{CO}_2$  liberated by respiration in stems, thus making  $\text{O}_2$  available for this process under light conditions. This is important in this organ to avoid anoxia and perturbation of wood formation (Pfan $\ddot{z}$  *et al.*, 2002). In this context, PEPC should also actively contribute to  $\text{CO}_2$  refixation in the light, but allows this process to be continued in the dark.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Jean-Louis Prioul for the gift of Rubisco LS antibodies. This research was financed by the

IFR87 'La Plante et son Environnement' (Gif-sur-Yvette, France) and the French projects 'Ministère d $\acute{e}$ l $\acute{e}$ gu $\acute{e}$   $\grave{a}$  la recherche – ACI Jeunes Chercheurs' no. JC10009 and 'Programme National ACI/FNS ECCO, PNBC' (convention no. 0429 FNS). The ESE laboratory is supported by the University of Paris-Sud, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and AgroParisTech.

### References

- Aschan G, Pfan $\ddot{z}$  H. 2003. Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* **198**: 81–97.
- Aschan G, Pfan $\ddot{z}$  H. 2006. Why snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) tepals have green marks? *Flora* **201**: 623–632.
- Aschan G, Pfan $\ddot{z}$  H, Vodnik D, Bati $\check{z}$  F. 2005. Photosynthetic performance of vegetative and reproductive structures of green hellebore (*Helleborus viridis* L. agg.). *Photosynthetica* **43**: 55–64.
- Berveiller D, Damesin C. (in press). Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Trees – Structure and Function*.
- Berveiller D, Kierzkowski D, Damesin C. 2007. Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. *Tree Physiology* **27**: 53–61.
- Boardman NK. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 355–377.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Buns R, Acker G, Beck E. 1993. The plastids of the yew tree (*Taxus baccata* L.): ultrastructure and immunocytochemical examination of chloroplastic enzymes. *Botanica Acta* **106**: 32–41.
- Cernusak LA, Marshall JD. 2000. Photosynthetic refixation in branches of western pine. *Functional Ecology* **14**: 300–311.
- Damesin C. 2003. Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytologist* **158**: 465–475.
- Dima E, Manetas Y, Psaras GK. 2006. Chlorophyll distribution pattern in inner stem tissues: evidence from epifluorescence microscopy and reflectance measurements in 20 woody species. *Trees – Structure and Function* **20**: 515–521.
- Echevarria C, Pacquit V, Bakrim N, Osuna L, Delgado B, Arriodupont M, Vidal J. 1994. The effect of pH on the covalent and metabolic control of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum leaf. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **315**: 425–430.
- Giglioli-Guivarc'h N, Pierre JN, Brown S, Chollet R, Vidal J, Gadal P. 1996. The light-dependent transduction pathway controlling the

- regulatory phosphorylation of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant Cell* 8: 573–586.
- Gousset-Dupont A, Leboutteiller B, Monreal J, Echevarria C, Pierre JN, Hodges M, Vidal J. 2005. Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 169: 1096–1101.
- Hibberd JM, Quick WP. 2002. Characteristics of  $C_4$  photosynthesis in stems and petioles of  $C_3$  flowering plants. *Nature* 415: 451–454.
- Höll W. 1973. Enzyme activities in wood tissue as affected by different methods of homogenizing. *Holzforschung* 27: 19–20.
- Höll W. 1974. Dark  $CO_2$  fixation by cell-free preparations of the wood of *Robinia pseudoacacia*. *Canadian Journal of Botany* 52: 727–734.
- Ivanov AG, Krol M, Sveshnikov D, Malmberg G, Gardeström P, Hurry V, Öquist G, Huner NPA. 2006. Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine. *Planta* 223: 1165–1177.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Latzko E, Kelly GJ. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in  $C_3$  plants. *Physiologie Végétale* 21: 805–815.
- Leboutteiller B, Gousset-Dupont A, Pierre JN, Bleton J, Tchapla A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Vidal J. 2007. Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 172: 265–272.
- Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, Cretin C. 1994. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Science* 99: 111–124.
- Levizou E, Manetas Y. 2006. Photosynthetic pigment contents in twigs of 24 woody species assessed by in vivo reflectance spectroscopy indicate low chlorophyll levels but high carotenoid/chlorophyll ratios. *Environmental and Experimental Botany* 59: 293–298.
- Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. 1997. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less,  $C_4$ -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiology* 115: 1681–1689.
- Nilsen ET. 1995. Stem photosynthesis: extent, patterns, and role in plant carbon economy. In: Gartner B, eds. *Stems and trunks in plant form and function*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 223–240.
- O'leary MH. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's review. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 397–315.
- Pfanz H, Aschan G, Langenfeld-Heyser R, Wittmann C, Loose M. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* 89: 147–162.
- Pilarski J, Tokarz K. 2006. Chlorophyll distribution in the stems and trunk of beech trees. *Acta Physiologiae Plantarum* 28: 233–236.
- Schaedle M, Brayman A. 1986. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity of *Populus tremuloides* Michx. bark tissues. *Tree Physiology* 1: 53–56.
- Spurr AR. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31–43.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible W-R, Krapp A. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* 53: 959–970.
- Sun Q, Yoda K, Suzuki M, Suzuki H. 2003. Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *Journal of Experimental Botany* 54: 1627–1635.
- Svensson P, Blasing OE, Westhoff P. 2003. Evolution of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 180–188.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE. 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial  $C_4$  plant photosynthesis. *Nature* 414: 543–546.
- Wittmann C, Pfanz H, Loreto F, Centritto M, Pietrini F, Alessio G. 2006. Stem  $CO_2$  release under illumination: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell & Environment* 29: 1149–1158.
- Wittmann C, Pfanz H, Pietrini F. 2005. Light-modulation of cortical  $CO_2$ -refixation in young birch stems (*Betula pendula* Roth.). *Phyton – Annales Rei Botanicae* 45: 195–212.



## About New Phytologist

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at [www.newphytologist.org](http://www.newphytologist.org).
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *OnlineEarly* – our average submission to decision time is just 30 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £135 in Europe/\$251 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office ([newphytol@lancaster.ac.uk](mailto:newphytol@lancaster.ac.uk); tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office ([newphytol@ornl.gov](mailto:newphytol@ornl.gov); tel +1 865 576 5261).



***V) IMPACT D'UN APPORT  
D'AZOTE SUR L'ASSIMILATION  
DE CARBONE PAR LA TIGE***

---



## PRESENTATION

L'azote est, avec le carbone, la ressource principale pour la croissance de la plante. L'azote existe sous différentes formes dans le sol, principalement sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Les plantes supérieures sont capables d'absorber et d'assimiler les deux formes azotées mais cette absorption dépend, entre autre, des concentrations de l'une ou de l'autre forme dans le sol. Ainsi, comme chez les plantes herbacées (Lee & Drew, 1989), la présence d'ammonium dans le sol inhibe fortement l'absorption de nitrate chez les arbres des forêts tempérées (Finlay *et al.*, 1989; Rennenberg *et al.*, 1996; Kreuzwieser *et al.*, 1997; Gessler *et al.*, 1998). Alors que le nitrate représente la forme prédominante en milieu agricole, c'est l'ammonium qui est majoritaire dans les sols forestiers (Glass & Siddiqi, 1995). Après avoir été absorbé, l'azote est principalement assimilé au niveau des racines, chez les arbres, ou des feuilles, chez les plantes herbacées, puis sera distribué vers les différentes fonctions de la plante.

Les stratégies d'allocation de l'azote dans les différents constituants de la plante dépendent de son mode de vie. De manière générale, alors qu'une espèce annuelle investira une grande proportion de son azote dans la reproduction et la formation des graines, une espèce pérenne adoptera plutôt une stratégie de conservation des ressources. Ainsi, chez la majorité des arbres à feuillage caduc (hêtre, chêne, charme, ...), l'azote investi initialement dans la construction des feuilles (période de débourrement) sera remobilisé vers les réserves azotées de la plante (période de sénescence foliaire), sous forme notamment de protéines de stockages localisées dans les compartiments ligneux aérien et souterrain.

Les métabolismes de l'azote et du carbone sont ainsi étroitement liés. La plante investit une grande partie de l'azote dans la fonction de photosynthèse et notamment dans les thylakoïdes (chlorophylle, chaîne de transport d'électrons, etc.) et dans la Rubisco. La Rubisco représente près de 40 % des protéines solubles totales de la plante (Spreitzer & Salvucci, 2002). Lorsque la quantité d'azote dans la feuille augmente, le contenu et l'activité Rubisco augmentent ce qui se traduit alors par une augmentation de l'assimilation de carbone. La relation entre l'assimilation à éclaircissement saturant ( $A_{\text{max}}$ ) et le contenu en azote a été montrée chez de nombreuses espèces. Selon l'espèce et la structure de la feuille (LMA), la relation est généralement robuste et linéaire mais la pente varie (Field & Mooney, 1986; Evans, 1989).

Bien que l'azote soit majoritairement investi dans la Rubisco (à hauteur de 15-20 %, Evans, 1989), d'autres enzymes n'en restent pas moins impliquées dans les interactions entre le métabolisme carboné et le métabolisme azoté. C'est le cas de la PEPC, située à un important carrefour entre le métabolisme carboné et le métabolisme azoté (**figure 23**). En effet, l'assimilation d'azote nécessite des squelettes carbonés tels que l'acide oxaloacétique (OAA) et l' $\alpha$  Ketoglutarate. Lorsque la demande est élevée, la PEPC fournit, via la voie anaplérotique, des composés carbonés supplémentaires (OAA, malate) au cycle de Krebs afin de compenser les "pertes" vers la synthèse d'acides aminés tels que la glutamine et le glutamate (Huppe & Turpin, 1994). Plusieurs études ont fait état d'une stimulation de la PEPC (augmentation des transcrits et de l'activité) dans les racines et les feuilles de plusieurs espèces de plantes lorsqu'elles sont soumises à un apport en ammonium (pour revue, Lepiniec *et al.*, 1994).

L'étude interspécifique (**chapitre II**) montre une relation linéaire entre la photosynthèse des tiges et leurs contenus en azote. D'après nos connaissances, c'est la première fois que cette relation a été montrée sur des tiges d'arbres. A l'échelle de l'individu, l'azote est alloué principalement aux feuilles avec une répercussion sur la photosynthèse foliaire.

**Est-ce qu'un apport supplémentaire d'azote à la plante induit aussi une augmentation d'azote dans les tiges avec une stimulation de leur photosynthèse ? Est-ce que la PEPC des tiges peut également être stimulée par cet apport supplémentaire en azote ?**



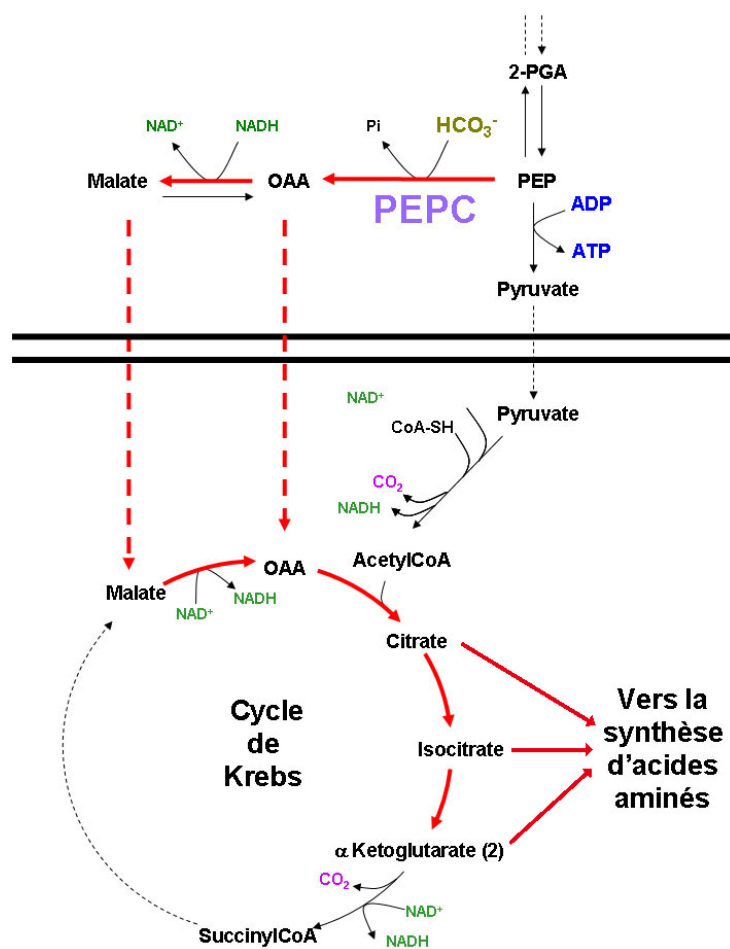


Figure 23 : fonction anaplerotique de la PEPC chez les plantes qui consiste à soutenir la production d'intermédiaire du cycle de Krebs quand l'assimilation d'azote nécessite des squelettes carbonés pour former les acides aminés par l'intermédiaire notamment de la glutamate synthase (GS) et de la GOGAT (glutamine -  $\alpha$  Ketoglutarate aminotransferase).

Afin de répondre à ces questions, nous avons mené une expérimentation en conditions semi-contrôlées sur de jeunes hêtres (4 ans). Pour s'abstenir le plus possible de l'influence des réserves azotées sur le fonctionnement de l'arbre, les hêtres ont été plantés en pot en décembre 2005 puis arrosés sans aucun apport d'engrais durant toute l'année 2006. Ces arbres ont ensuite été soumis, un mois avant le débournement, à différents traitements azotés :

- Traitement T1 : NPK 2-3-4 (g par élément),
- Traitement T2 : NPK 5-3-4 (g par élément),
- Traitement T3 : NPK 10-3-4 (g par élément).

Au cours de l'été 2007, les tiges de l'année ont été étudiées. Le métabolisme azoté a en partie été suivi par la mesure des activités GOGAT et GS. En ce qui concerne le métabolisme carboné, nous avons mesuré les échanges gazeux (obscurité et éclaircissement saturant), le contenu en azote total et les activités PEPC et Rubisco.

## PRINCIPAUX RESULTATS

Les traitements T2 et T3 ont eu pour conséquence l'augmentation du contenu en azote d'un facteur 1.6 et 1.4 (par rapport au traitement T1) dans les feuilles et tiges de l'année. Malgré un apport azoté plus important, **le traitement T3 a eu donc un effet plus faible que le traitement T2 sur la quantité d'azote total alloué aux organes**. Nous supposons que l'apport trop important en ammonium (issu de l'urée apporté par l'engrais utilisé) a causé **une acidification du milieu** ce qui a eu pour effet **d'inhiber son absorption**. Les activités GS et GOGAT mesurées sur les tiges de l'année n'ont révélé aucune différence significative entre les traitements (résultats non présents dans l'article).

L'activité GS mesurée sur les feuilles a été stimulée par les traitements azotés T2 et T3 alors que l'activité GOGAT n'a pas changée. Puisque l'assimilation d'azote a lieu préférentiellement dans les racines chez les arbres (voir plus haut), ce résultat suggère que la voie photosrespiratoire a été stimulée, la GS utilisant le  $\text{NH}_4^+$  libéré par l'une des étapes de la photorespiration, au niveau du complexe glycine décarboxylase.

Comme nous l'avons également montré lors de l'étude interspécifique (**chapitre II**), cette étude-ci révèle **une relation positive entre la concentration en azote total dans les tiges et l'assimilation brute des tiges**. Contrairement à ce qui est généralement observé chez les feuilles, i.e. relation linéaire entre assimilation et azote, nous avons montré une relation hyperbolique entre l'assimilation brute et le contenu en azote, du type :

$$P_g = \frac{9.73 \times (N - 4.67)}{1.28 + (N - 4.67)}$$

où  $P_g$  correspond à l'assimilation brute maximale mesurée à éclaircissement saturant et N, la concentration en azote total de la tige de l'année. La valeur 9.73 correspond à une assimilation théorique maximale (en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) dans le cas où la concentration en azote est très importante, et la valeur 4.67 à la concentration d'azote (en  $\text{mg N g}^{-1}$ ) pour  $P_g=0$ .

Le même type de relation a été obtenu entre la concentration en azote total dans les tiges et la respiration à l'obscurité. La refixation de  $\text{CO}_2$  par la tige calculée à partir des mesures d'échanges gazeux est similaire aux études précédentes mais **plus le contenu en azote de la tige augmente, plus le taux de refixation augmente** passant ainsi de 60 % de refixation dans le traitement T1 à plus de 73 % dans le traitement T2. Bien que la concentration en azote soit également reliée à la respiration, il semblerait donc que plus la quantité d'azote augmente, plus son allocation dans les processus de refixation de  $\text{CO}_2$  est importante.

Les relations trouvées chez les feuilles permettent de calculer un seuil d'azote à  $0.5 \text{ mmol N g}^{-1}$ , seuil à partir duquel la photosynthèse est fonctionnelle (Field & Mooney, 1986). Nous montrons dans cette étude que ce seuil serait de  $0.33 \text{ mmol N g}^{-1}$  pour les tiges de l'année de hêtre. Cela suggère donc que **la photosynthèse des tiges est fonctionnelle à des concentrations en azote plus faible que dans la feuille**.

Généralement, plus le contenu en azote de l'organe photosynthétique augmente, plus la quantité d'azote alloué à la Rubisco augmente et donc plus l'activité Rubisco augmente (Evans, 1989). Cette observation n'a pas été observée ni sur les feuilles, ni sur les tiges de l'année de hêtre au cours de cette étude. En revanche, l'activité PEPC a augmenté avec la concentration en azote dans l'organe. Nous suggérons alors que **l'apport d'azote à la plante a stimulé la photosynthèse des tiges en augmentant l'incorporation de carbone par la PEPC dans le métabolisme carboné**. Les métabolismes carboné et azoté au niveau de la tige semblent être en étroite relation.

Des expériences de marquages au  $^{13}\text{C}$  et éventuellement  $^{15}\text{N}$  permettraient de connaître les interactions entre le métabolisme azoté et carboné dans la tige. Quelle est la part de carbone assimilé par la tige et réinvestit à une échelle locale ? Est-ce que des squelettes carbonés produits par la photosynthèse des tiges sont utilisés au niveau racinaire pour l'incorporation de l'azote dans le métabolisme ?



**ARTICLE :**

**EFFECT OF VARIED SOIL NITROGEN SUPPLY ON THE CARBON ASSIMILATION BY TREE STEMS**

BERVEILLER Daniel, FRESNEAU Chantal & DAMESIN Claire

*En préparation*

Juin 2008



## Effect of soil nitrogen supply on the carbon assimilation by tree stems

### Abstract

The nitrogen (N) is one of the most important resources for the plant. A soil N supply generally enhances the photosynthesis because most of N is especially allocated in Rubisco and thylakoids. This is well known in leaves for which photosynthesis (gas exchange, Rubisco activity, chlorophyll content) is positively correlated to the leaf N concentrations. In order to confirm this observation in stem, N concentrations, gas exchange and Rubisco and PEPC activities were measured in current-year stems of young European beeches (*Fagus sylvatica* L.) which were submitted to different soil N supply. The CO<sub>2</sub> refixation rate of stems increased from 58.5% to 74.3% when stem N concentration increased from 5.7 to 10.1 mg g<sup>-1</sup>. A hyperbolic relationship was obtained between stem gross photosynthesis and N concentration, declining to zero at 0.3 mmol N g<sup>-1</sup>. Regarding carboxylating enzymes, stem PEPC activity was higher in stems than in leaves and increased with stem N concentrations whereas Rubisco activity did not change between treatments in both tissues. In spite of low nitrogen investment in stem photosynthesis (low PNUE), these results show that (1) stem invest more N to CO<sub>2</sub> refixation when more N is available, (2) stem photosynthesis is able to operate at very low N concentration and (3) stem PEPC is probably involved in stem carbon refixation by supplying concurrently carbon skeleton to root N assimilation.

### Key Words:

Stem photosynthesis, nitrogen, PEPC, Rubisco, *Fagus sylvatica*.

## Introduction

Along with carbon (C), nitrogen (N) is the most significant resource for plant growth. In temperate ecosystems, soil nitrogen is a limiting element for plant growth because its concentration is kept low due to losses by leaching and microbial consumption (Tischner, 2000). The N uptake occurs predominantly in roots by nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and/or ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Pate, 1973). In forest trees, N assimilation occurs mainly in roots while it occurs in leaves and roots of herbaceous plants (Martin & Plassard, 1997). Whereas nitrate typically predominates in agricultural soils with high N turnover, neutral pH and good aeration, ammonium plays an important role in forest soils (Glass & Siddiqi, 1995). Like in herbaceous plants (Lee & Drew, 1989), nitrate uptake by roots of most tree species is strongly inhibited when ammonium is available (Rennenberg *et al.*, 1996; Kreuzwieser *et al.*, 1997; Gessler *et al.*, 1998). However, in some species like ash and oak, ammonium has a positive effect on nitrate uptake (Stadler *et al.*, 1993). In trees, the ammonium uptake generally shows a seasonal course with maximum uptake rates in mid-summer (Gessler *et al.*, 1998). The N uptake during bud break in spring is very low because the N demand could be almost completely satisfied by remobilized N from storage tissues (Millard & Proe, 1992; Millard, 1994). Indeed, during the leaf-fall period, a large part of the leaf N is stored in shoots as vegetative storage proteins (VSPs) that constitute the predominant proteins in dormant organs, especially the woody compartment (Stepien *et al.*, 1994; Rowland & Arora, 1997). In summer, the bark apparently works as a transit area for nitrogen components and, in particular, for the free amino acids synthesized in the roots and carried in sap (Gomez & Faurobert, 2002).

The woody compartment is known to be an important source of C loss by respiration (Granier *et al.*, 2000; Damesin *et al.*, 2002), but the stems are also able to assimilate C (Pearson & Lawrence, 1958; Wiebe, 1975; Kharouk *et al.*, 1995; Pfanz *et al.*, 2002). This photosynthesis occurs particularly in the bark chlorenchyma and mainly consists of the re-fixation of C lost by respiration (Cernusak & Marshall, 2000; Damesin, 2003). Re-fixation of  $\text{CO}_2$  in young stems may compensate for 60–90% of the potential respiratory C loss and may sometimes exceed  $\text{CO}_2$  release (Wittmann *et al.*, 2001; Damesin, 2003; Berveiller *et al.*, 2007a). The other processes potentially involved in the decrease of  $\text{CO}_2$  release under illumination, i.e. photorespiration and inhibition of mitochondrial respiration, do not play a predominant role in stem carbon exchange (Wittmann *et al.*, 2006). Although proportionately much lesser than leaves, some ecophysiological characteristics of stem photosynthesis are similar to those of leaves such as the positive response of gas exchange to light and temperature (Wittmann *et al.*, 2001; Wittmann & Pfanz, 2007), the positive response of electron transport rate to light (Manetas, 2004), and the presence of Rubisco (Schaedle & Brayman, 1986; Berveiller *et al.*, 2007b; Berveiller & Damesin, 2008). Over a whole season, current-year stems of European beech (*Fagus sylvatica*) are able to assimilate the equivalent of 40% of the C lost by respiration over a whole season (Damesin, 2003).

A great number of papers concerning the interaction between C- and N-metabolisms in leaves are available. Both depend on each other and both pathways are regulated by each other. Plant especially allocates N to the leaves and to the photosynthesis function, i.e. Rubisco, thylakoides. Strong correlations exist between C assimilation rate or Rubisco activity and leaf N concentration (Evans, 1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is an important cross point between the two metabolisms as it takes place in supplying oxaloacetate to the Krebs cycle, thus ensuring a continuous replenishment of  $\text{C}_4$ -dicarboxylic acid, which is necessary for nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis (Huppe & Turpin, 1994). We recently showed a very high activity of PEPC in young stems in comparison with leaves of European beech (Berveiller *et al.*, 2007b; Berveiller & Damesin, 2008) and that stem photosynthesis is positively correlated to the nitrogen concentration in a interspecific study (Berveiller *et al.*, 2007a). Contrary to leaves, interactions between C- and N-metabolisms in woody stems are poor documented except concerning the role of woody compartment as a N storage tissue during the winter period. In this context, we conducted experimentation on young European beeches planted in pots with three levels of N fertilization. Our goal was to determine if N has an impact on tree carbon metabolism, especially on  $\text{CO}_2$  exchange. The N has a generally a positive impact on the stem respiration (Ryan, 1991) but is this the case with stem photosynthesis?

## Materials and Methods

### Site description, plant materials and nitrogen supplies

The experiment was conducted on the campus of the University of Paris-Sud (48°42' N, 02°10' E), 25 km south-west of Paris, France. At this location, near the laboratory, a set of nine four-year-old European beech trees (*Fagus sylvatica* L.) were planted outside in 90 litres pots during winter December 2005. The soil substrates consisted of a mix of 50% (v/v) peat and 50% (v/v) sand; its characteristics are detailed in Table 1. It was a sand soil, poor in nitrogen, with a high C/N ratio and rather neutral-basic. All the trees were watered every two weeks (depending on the rain) during the whole of 2006 without any supply of soil nitrogen. The detailed characteristics of the soil substrate are detailed in table 1.

In March 2007, i.e. one month before budburst, all the trees were subjected to fertilizer ("Opta Fond Plus" (BHS, Vemar, France) NPK 10–15–20 + 25% SO<sub>3</sub> + trace elements), at a proportion of 20 g per pot. At the same time, three trees were subjected to an additional supply of 7.5 g fertilizer per pot ("Optacote 40N" (BHS, Vemar, France) NPK 40–0–0) and three other trees to 20 g per pot of "Optacote 40N". "Opta Fond Plus" and "Optacote 40N" consist of coated and compacted granules that slowly release nitrogen into the soil during six months. Thus, three treatments (with three trees per treatment) were achieved (expressed in grams of each element):

- Treatment T1: NPK 2–3–4,
- Treatment T2: NPK 5–3–4,
- Treatment T3: NPK 10–3–4.

### Gas-exchange measurements

In the middle of June 2007, three current-year stems of each tree were collected and gas exchange was measured with the LI-6400 portable photosynthesis system (LI-COR, Lincoln, NE) and the conifer chamber (Li-Cor Model 6400-05). Measurements were made at 20°C, with a CO<sub>2</sub> concentration of 390 µmol mol<sup>-1</sup>, 60 % relative humidity and 1400 or 0 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of photosynthetically active radiation (PAR) to determine CO<sub>2</sub> efflux rates in the light ( $R_l$ ) and in the dark, i.e., dark respiration rate ( $R_d$ ) (for further details of method employed for gas exchange see Berveiller et al. (2007a)). With assuming that an inhibition of respiration in light is unlikely to occur (Wittmann *et al.*, 2006), stem gross photosynthesis ( $P_g$ ) may be calculated as:

$$P_g = |R_d - R_l| \quad \text{eqn. (1)}$$

From gas exchange measurements, the refixation rate was calculated as follows:

$$\text{Refixation rate (\%)} = \frac{R_d - R_l}{R_d} \times 100 \quad \text{eqn. (2)}$$

After gas exchange measurements, stem areas were measured to express CO<sub>2</sub> efflux in terms of area units. Then, stem tissues were dried at 60°C for 48 h for nitrogen concentration measurements.

### Nitrogen concentration

At the end of June 2007, three leaves and current-year stems of each tree were sampled and dried at 60 °C for 48 h. Dry mass (DW) of each sample (sampled in middle of June for gas exchange measurement and at the end of June) was determined. Subsequently, the samples were cut into small pieces and ground to a powder (MM200, RETSCH, Haan, Germany). The nitrogen concentration of the powder was determined with an elemental analyzer at the "Service Central d'Analyse du CNRS" (Vernaison, France).



### **Protein extraction**

Frozen materials (500 mg) of leaves and whole stem segments were weighed rapidly, powdered with a pestle in a prechilled mortar under liquid N<sub>2</sub> and ground in an extraction buffer containing 100 mM HEPES (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 7% (w/w) polyethylene glycol 20000, 10 mM dithiothreitol, 10% (v/v) glycerol, three antiproteases (20 μM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride (*p*-APMSF), 1 μM pepstatin, 1 μM leupeptin) and an antiphosphatase cocktail (Sigma). During grinding, polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) was added. The homogenates were centrifuged for 25 min at 4 °C in a microcentrifuge (5804 R; EPPENDORF, Germany) at 15,000 g. An aliquot of the supernatant was used for protein determination. The remainder was passed through a desalting column (Sephadex G25<sup>TM</sup> Pharmacia; AMERSHAM, Sweden) for enzyme assays.

### **Enzyme assays**

According to Berveiller et al. (2007b), PEPC activity was measured at pH 7.8 in a buffer containing 100 mM Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 mM NADH, and 3 U ml<sup>-1</sup> malate dehydrogenase. This assay was initiated by the addition of 5 mM phosphoenolpyruvate (Uedan & Sugiyama, 1976; Tietz & Wild, 1991).

Rubisco initial and total activities were measured in a buffer containing 100 mM Hepes (pH 8), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.5 mM ATP, 0.2 mM NADH, 5 mM creatine phosphate, 5 U ml<sup>-1</sup> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5 U ml<sup>-1</sup> 3-phosphoglycerokinase, 5 U ml<sup>-1</sup> creatine phosphokinase. The assays were initiated by the addition of 0.5 mM ribulose-1,5-bisphosphate for the Rubisco initial activity and after 15 min incubation of the extract at 30 °C for the Rubisco total activity.

PEPC and Rubisco activities were determined spectrophotometrically following NADH oxidation at 340 nm. Activities were expressed in μmol CO<sub>2</sub> or HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> consumed per min and per mg proteins for Rubisco and PEPC respectively. Soluble protein concentrations were determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK). The statistical significances in N concentration, gas exchange, enzyme activities between the three nitrogen treatments were calculated with analyze of variance (ANOVA). Treatment effects were considered significant if  $P < 0.05$  (Fisher's LSD test). A nonlinear relationship was fitted between gross photosynthetic rate and nitrogen concentration using the following relationship:

$$P_g = \frac{a \times (N - b)}{c + (N - b)}, \quad \text{eqn. (3)}$$

where  $P_g$  is the gross photosynthetic rate,  $N$  is the total nitrogen concentration, and  $a$ ,  $b$ , and  $c$ , the three parameters obtained by ordinary least-squares estimation.

## Results

### Effect of N treatment on the N status of above ground parts

In treatment T1, beech trees accumulated nitrogen in above-ground parts with values reaching 10.2 mg g<sup>-1</sup> dry weight (DW) in leaves and 5.67 mg g<sup>-1</sup> in current-year stems (table 2). Additional supplies of nitrogen in soil (in treatments T2 and T3) resulted in a significant increase of nitrogen concentration in the leaves and current-year stems, expressed either in mass-based or area-based units (for stems). The nitrogen concentrations reached 17.2 and 10.1 mg g<sup>-1</sup> in treatment T2 and 14.1 and 8.00 mg g<sup>-1</sup> in treatment T3, for leaves and current-year stems, respectively. No significant differences were observed between treatments T2 and T3 either for leaves or current-year stems.

### Effect of N treatment on the gas exchange of current-year stems

Whatever the treatment, we observed a reduction of stem CO<sub>2</sub> efflux upon illumination, i.e. 60%, 74%, and 68% in treatments T1, T2 and T3, respectively (figure 1). In the treatment T1, dark respiration rate ( $R_d$ ) and gross photosynthesis rate ( $P_g$ ) were equal to 1.79 and 1.07  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively. The additional supplies of nitrogen (treatments T2 and T3) resulted in significant increase of the gas exchange.  $R_d$  increased rates by 83% and 66% between treatments T1 and T2 and between T1 and T3, respectively;  $P_g$  increased rates by 126% and 90% between treatments T1 and T2 and between T1 and T3, respectively. No significant difference was found for CO<sub>2</sub> efflux in the light between treatments for which the measurements ranged from -0.71  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (treatment T1) to -0.95  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (treatment T3).

### Relationships between gross photosynthesis rate, respiration rate and N concentration in current-year stems

Expressed in area unit and considering all the data from all treatments, the linear relationship observed between gross photosynthesis rate and dark respiration rate was significant ( $r^2 = 0.88$ ;  $P < 0.0001$ , figure 2). From this correlation, the carbon refixation by stem photosynthesis is calculated as 80% of the total respiration rate. Expressed in mass-based unit, the relation was also significant with  $r^2 = 0.84$  ( $P < 0.0001$ , data not shown). Regarding each treatment, calculation of the refixation rates were:  $58.5\% \pm 4.66$  for T1,  $74.3\% \pm 1.85$  for T2 and  $68.2 \pm 2.17$  for T3.

The gross photosynthesis rate values fitted well with the nitrogen concentrations values in current-year stems of European beech ( $r^2 = 0.83$ ;  $P < 0.0001$ , figure 3). The response of gross photosynthesis to the increase of nitrogen concentration followed a hyperbolic-type model. From this nonlinear model, the maximum gross photosynthetic rate for saturating nitrogen concentration was calculated to be 9.73  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### Effect of N concentration on soluble protein content and enzyme activities

The total soluble protein content increased with increasing tissue N concentrations (figure 4). The amount of proteins ranged from 6.0 mg g<sup>-1</sup> for treatment T1 to 10 mg g<sup>-1</sup> for treatment T2 for stems and from 19 mg g<sup>-1</sup> in treatment T1 to 34 mg g<sup>-1</sup> in treatment T2 for leaves.

Whatever the stem N concentration, Rubisco total activity was always higher in leaves than in current-year stems of beech (by a factor of about 10-12 times, figure 5a). In average, activity in leaves ranged from 10.2 to 11  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  and from 0.85 to 0.91  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  in current-year stems. No significant effect of stem N concentration was observed on the Rubisco activities, both in leaves or in current-year stems.

PEPC activity was from 1.9 to 3.4 times higher in current-year stems than in leaves (figure 5b). The PEPC activity in leaves ranged from 1.4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  in treatment T3 to 1.8  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  in treatment T2. In current-year stems, PEPC activity significantly increased with the N concentration ranging from 3.4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  at 5.67 mg N g<sup>-1</sup> to 5.4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  at 10.1 mg N g<sup>-1</sup>.

## Discussion

The carbon (C) and nitrogen (N) management in perennial species like European beech is complex because of the use and remobilization of N reserves, especially in bud-burst period, leaf-fall period, and in case of stress (Millard, 1994). It is generally difficult to obtain a large and significant effect of a soil N treatment on the metabolism and growth of trees. In our study, all the trees were planted in a N-poor soil with sand as main substrate with any supply of fertilizer during the whole 2006 year. In this way, we suggest the C- and N- reserves were partly used during this year to compensate the lack of N in soil, hoping to observe a positive effect of soil N supply on tree metabolism during 2007.

Although N treatments has not affected the leaf or stem structure (no difference in LMA or SMA with treatments), a positive effect of the soil nitrogen supply on the trees N status with a significant increase of total N concentrations in both leaves and current-years stems was observed (table 2). The N concentrations measured in leaves and stems for the treatment T2 were similar to that is commonly measured on current-year stems of adult trees, at the beginning of summer, i.e.  $20 \text{ mg g}^{-1}$  and  $10 \text{ mg g}^{-1}$  for leaves and current year stems, respectively (Damesin, 2003; Berveiller *et al.*, 2007a). Whether in stems or leaves, the N concentrations increased similarly between treatments T1 and T2 (increase by 1.7 time) or between T1 and T3 (increase by 1.4 time). The amount of N provided by the treatment T3 seemed to be excessive because the N accumulation in leaves and stems was lower in comparison to the treatment T2. The N source of the fertilizer we used is mainly composed of urea that releases ammonium through urease enzyme activity. The soil pH decreases when it is solely watered with ammonium solution (Volk *et al.*, 1992). As a consequence, a high supply in fertilizer (treatment T3) had probably force the pH down which had limited the N uptake by plant roots and N accumulation in leaves and current-year stems.

The reduction of stem  $\text{CO}_2$  efflux from dark to light is now well known and is due to C assimilation by the stem photosynthesis. Stem photosynthesis allows young stems of *Fagus sylvatica* to compensate for 70–90% of their  $\text{CO}_2$  loss by respiration, which corresponds to the refixation rate (Wittmann *et al.*, 2001; Damesin, 2003; Berveiller *et al.*, 2007a). Regarding data from all N treatments of this study, similar results were found with a linear relationship between gross photosynthesis rate and dark respiration rate, suggesting that, as in leaves, products of stem photosynthesis are partially and directly used as substrates for respiration to sustain protein turn-over (McCree, 1969). We found a hyperbolic relationship between dark respiration rates and stem N concentration (data not shown). It can be explain by the fact that, because about 60% of maintenance respiration ( $R_m$ ) supports protein repair and replacement (De Vries, 1975), stem maintenance respiration rate and tissue N concentration are correlated (e.g. Ryan (1991)).

Interestingly, the refixation rates increased with increasing stem N concentration. It is explained by the increase of  $\text{CO}_2$  efflux measured in the dark ( $R_d$ ) when stem N concentration increased, while  $\text{CO}_2$  efflux in the light ( $R_l$ ) remained nearly unchanged. It has been reported that allocation of nitrogen to photosynthetic apparatus increases in herbaceous species with increasing nitrogen availability (Evans, 1989; Makino *et al.*, 1994) but not in trees (Bauer *et al.*, 2001; Ripullone *et al.*, 2003). The photosynthetic nitrogen use efficiency of current-year stems of beech (PNUE, calculated as C assimilation rate to N concentration ratio) increased from  $9.4 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mol N})^{-1} \text{s}^{-1}$  to 11.3 and  $12.2 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mol N})^{-1} \text{s}^{-1}$ , in T1, T2, and T3 treatments respectively, but no significant differences were found for PNUE between the N treatments. These values are close to precedent values measured on current-years stems of adult trees (Berveiller *et al.*, 2007a) but much more lower than values classically measured on leaves (Poorter & Evans, 1998). As well as needles of conifers, the low N investment in stem photosynthesis could be the consequence of the long lifespan of these tissues that rather invest more N in compounds required for longevity (lifespan) and defense (Field & Mooney, 1986; Hikosaka *et al.*, 1998).

Relationships between light-saturated photosynthetic rate and N concentration have been widely documented for leaves (Field & Mooney, 1986; Evans, 1989). This relationship exists for stems of various tree species (Berveiller *et al.*, 2007a) and is valid for a given species. These relationships are generally linear, but in this study, the mass-based and area-based relationships were

found hyperbolic, that is not surprising because dark respiration is correlated to gross photosynthetic rate (see above). From data of various plant species, Field & Mooney (1986) show that about  $0.5 \text{ mmol N g}^{-1}$  is the minimum required for a positive net assimilation. In this study, the mass-based hyperbolic curve declined to zero at  $4.4 \text{ mg N g}^{-1}$ , i.e.  $0.3 \text{ mmol N g}^{-1}$ . As a result and compared to leaves, it seems that stem photosynthesis is able to operate at very low N concentrations.

The photosynthetic capacity is generally related to N concentration primarily because the protein of the Calvin cycle and thylakoids represents the majority of leaf nitrogen (Evans, 1989). Rubisco is the major carboxylating enzyme in leaves and its activity is highly correlated to the leaf N concentration (Sage *et al.*, 1987). Whereas the soluble protein content in leaves and stems of beeches increased by twice in response to the rise in tissue N concentrations (figure 4), the N treatment had no significant effect on Rubisco, either in stems or leaves (figure 5a). A possible explanation of the absence of effect on stem and leaf Rubisco activity is that the beech trees has been so stressed by the absence of N during one year that N has been then more invested in maintenance of living tissues than in photosynthesis function. The activation level of Rubisco being very similar in stems and leaves (69% and 71% respectively), it could be calculated that the Rubisco activities mirrored the concentrations of Rubisco in both tissues. As a result, Rubisco concentrations were twenty times lower in stems than in leaves.

As it was shown in previous studies (Berveiller *et al.*, 2007a; Berveiller *et al.*, 2007b; Berveiller & Damesin, 2008), stem PEPC activity was higher in stems than in leaves of beech suggesting that the enzyme is involved in stem photosynthesis (figure 5b). While no significant differences were observed in PEPC activity between treatments for leaves, activity increased by 1.6 times in stems with tissue N concentration increasing from  $5.7$  to  $10.1 \text{ mg g}^{-1}$ . This observation goes in the same way that the positive relationship observed between stem gross photosynthesis and N concentration (figure 3). PEPC is known to be stimulated by nitrogen supply because it takes place in supplying carbon skeleton to the Krebs cycle (anaplerotic carbon fixation), thus ensuring a continuous replenishment of  $\text{C}_4$ -dicarboxylic acid, which is necessary for nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis (Huppe & Turpin, 1994). In forest trees, N assimilation occurs solely in roots, with most of them being associated with mycorrhizal fungi (Martin & Plassard, 1997). Thus, along with carbon refixation, the stem PEPC would be able to supply the roots in carbon skeleton for N assimilation.

## Conclusion

As it is commonly observed in leaves, an increase in soil nitrogen supply had a positive impact on stem gas exchange and stem carbon refixation. Although similar relationships were found between dark respiration rate and stem N concentration and between gross photosynthetic rate and N concentration, stem seems to invest more N in the process of  $\text{CO}_2$  refixation when more N is available. PEPC activity increased in current-year stems with N concentrations suggesting that it is involved both in carbon refixation and indirectly in N assimilation. PEPC is probably involved in carbon refixation in stems and concurrently supply root N assimilation in carbon skeleton. Further investigations using  $^{13}\text{C}$  as a tracer could be helpful to examine how much C is invested in the different functions of the stem, particularly N assimilation.

## Acknowledgments

This research was financed by the “Programme National ACI/FNS ECCO, PNBC” (convention no.0429 FNS). The ESE laboratory is supported by the University of Paris-Sud, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and AgroParisTech.

## References

- Bauer GA, Berntson GM, Bazzaz FA. 2001.** Regenerating temperate forests under elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen deposition: comparing biochemical and stomatal limitation of photosynthesis. *New Phytologist* **152**(2): 249-266.
- Berveiller D, Damesin C. 2008.** Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Trees-Structure and Function*(22): 149-157.
- Berveiller D, Kierzkowski D, Damesin C. 2007a.** Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. *Tree Physiology* **27**: 53-61.
- Berveiller D, Vidal J, Degrouard J, Ambard-Bretteville F, Jaillard D, Damesin C. 2007b.** Tree stem phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC): lack of biochemical and localization evidence for a C<sub>4</sub>-like photosynthesis system. *New Phytologist* **176**: 775-781.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Cernusak LA, Marshall JD. 2000.** Photosynthetic refixation in branches of Western Pine. *Functional Ecology* **14**: 300-311.
- Damesin C. 2003.** Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytologist* **158**(3): 465-475.
- Damesin C, Ceschia E, Le Goff N, Ottorini J-M, Dufrière E. 2002.** Stem and branch respiration of beech: from tree measurements to estimations at the stand level. *New Phytologist* **158**(3): 159-172.
- De Vries FWTP. 1975.** The cost of maintenance processes in plant cells. *Annals of Botany* **39**(1): 77-92.
- Evans JR. 1989.** Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia* **78**(1): 9-19.
- Field C, Mooney HA 1986.** The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: T. J. Givnish, ed, *On the economy of plant form and function*. Cambridge: Cambridge University Press, 25-55.
- Gessler A, Schneider S, Von Sengbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreutzer K, Rennenberg H. 1998.** Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist* **138**(2): 275-285.
- Glass ADM, Siddiqi MY 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. In: H. S. StrivastavaR. P. Singh, eds. *Nitrogen Nutrition in Higher Plants*. New Delhi: Associated Publishing Co., 21-56.
- Gomez L, Faurobert M. 2002.** Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Experimental Botany* **53**(379): 2431-2439.
- Granier A, Ceschia E, Damesin C, Dufrene E, Epron D, Gross P, Lebaube S, Le Dantec V, Le Goff N, Lemoine D, Lucot E, Ottorini J-M, Pontailler J-Y, Saugier B. 2000.** The carbon balance of a young Beech forest. *Functional Ecology* **14**(3): 312-325.
- Hikosaka K, Hanba YT, Hirose T, Terashima I. 1998.** Photosynthetic nitrogen-use efficiency in leaves of woody and herbaceous species. *Functional Ecology* **12**(6): 896-905.
- Huppe HC, Turpin DH. 1994.** Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism in Plant and Algal Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**(1): 577-607.
- Kharouk VI, Middleton EM, Spencer SL, Rock BN, Williams DL. 1995.** Aspen bark photosynthesis and its significance to remote sensing and carbon budget estimates in the boreal ecosystem. *Water Air and Soil Pollution* **82**: 483-497.
- Kreuzwieser J, Herschbach C, Stulen I, Wiersema P, Vaalburg W, Rennenberg H. 1997.** Interactions of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and L-glutamate with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport processes of non-mycorrhizal *Fagus sylvatica* roots. *Journal of Experimental Botany* **48**(7): 1431-1438.
- Lee RB, Drew MC. 1989.** Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany* **40**(7): 741-752.
- Makino A, Nakano H, Mae T. 1994.** Responses of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase, Cytochrome-F, and Sucrose Synthesis Enzymes in Rice Leaves to Leaf Nitrogen and Their Relationships to Photosynthesis. *Plant Physiology* **105**(1): 173-179.

- Manetas Y. 2004.** Probing cortical photosynthesis through *in vivo* chlorophyll fluorescence measurements: evidence that high internal CO<sub>2</sub> levels suppress electron flow and increase the risk of photoinhibition. *Physiologia Plantarum* **120**(3): 509-517.
- Martin F, Plassard C 1997.** Assimilation de l'azote par les symbioses ectomycorhiziennes. In: J.-F. Morot-Gaudry, ed, *Assimilation de l'azote des chez les plantes*. Paris: INRA, 179-193.
- McCree KJ 1969.** An equation for the rate of respiration of white clover plants grown under controlled conditions. In. *Proceedings of the technical meeting IBP*. Trebon (CSK): Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 221-229.
- Millard P. 1994.** Measurements of the remobilization of nitrogen for spring leaf growth of trees under field conditions. *Tree Physiology* **14**: 1049-1054.
- Millard P, Proe MF. 1992.** Storage and internal cycling of N in relation to seasonal growth of sitka spruce. *Tree Physiology* **10**: 33-43.
- Pate JS. 1973.** Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biology and Biochemistry* **5**(1): 109-119.
- Pearson LC, Lawrence DB. 1958.** Photosynthesis in aspen bark. *American Journal of Botany* **45**: 383-327.
- Pfanz H, Aschan G, Langenfeld-Heyser R, Wittmann C, Loose M. 2002.** Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* **89**(4): 147-162.
- Poorter H, Evans JR. 1998.** Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia* **116**(1-2): 26-37.
- Rennenberg H, Schneider S, Weber P. 1996.** Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field. *Journal of Experimental Botany* **47**(10): 1491-1498.
- Ripullone F, Grassi G, Lauteri M, Borghetti M. 2003.** Photosynthesis-nitrogen relationships: interpretation of different patterns between *Pseudotsuga menziesii* and *Populus x euroamericana* in a mini-stand experiment. *Tree Physiology* **23**(2): 137-144.
- Rowland LJ, Arora R. 1997.** Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. *Plant Science* **126**(2): 119-144.
- Ryan MG. 1991.** Effects of climate on change on plant respiration. *Ecological Applications* **1**(2): 157-167.
- Sage RF, Percy RW, Seemann JR. 1987.** The nitrogen use efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plants: 3. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiology* **85**(2): 355-359.
- Schaedle M, Brayman A. 1986.** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity of *Populus tremuloides* Michx. bark tissues. *Tree Physiology* **1**: 53-56.
- Stadler J, Gebauer G, Schulze ED. 1993.** The influence of ammonium on nitrate uptake and assimilation in 2-year-old ash and oak trees - a tracer study with <sup>15</sup>N. *Isotopenpraxis* **29**(1-2): 85-92.
- Stepien V, Sauter JJ, Martin F. 1994.** Vegetative storage proteins in woody-plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**(2): 185-192.
- Tietz S, Wild A. 1991.** Investigations on the phosphoenolpyruvate carboxylase activity of spruce needles relative to the occurrence of novel forest decline. *Journal of Plant Physiology* **137**: 327-331.
- Tischner R. 2000.** Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell and Environment* **23**(10): 1005-1024.
- Uedan K, Sugiyama T. 1976.** Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiology* **57**: 906-910.
- Volk R, Chaillou S, Mariotti A, Morotgaudry JF. 1992.** Beneficial effects of concurrent ammonium and nitrate nutrition on the growth of *Phaseolus vulgaris* - a N<sub>15</sub> study. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**(4): 487-493.
- Wiebe HH. 1975.** Photosynthesis in wood. *Physiologia Plantarum* **332**: 45-46.
- Wittmann C, Aschan G, Pfanz H. 2001.** Leaf and twig photosynthesis of young beech (*Fagus sylvatica*) and aspen (*Populus tremula*) trees grown under different light regime. *Basic and Applied Biology* **2**: 145-154.

- Wittmann C, Pfanz H. 2007.** Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) trees. *Journal of Experimental Botany* **58**(15-16): 4293-4306.
- Wittmann C, Pfanz H, Loreto F, Centritto M, Pietrini F, Alessio G. 2006.** Stem CO<sub>2</sub> release under illumination: corticular photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell and Environment* **29**(6): 1149-1158.

## Tables

Soil subtract characteristics		Mean values
Texture	Clay (< 2µm) g kg <sup>-1</sup>	37.2 ± 3.0
	Silt ( 2/50 µm) g kg <sup>-1</sup>	15.6 ± 2.04
	Sand (50/2000 µm) g kg <sup>-1</sup>	947 ± 4.5
Organic carbon (C)	g kg <sup>-1</sup>	40.1 ± 3.44
Total nitrogen (N)	g kg <sup>-1</sup>	0.72 ± 0.05
C/N ratio		51.8 ± 1.14
Organic matter	g kg <sup>-1</sup>	64.1 ± 3.80
pH in water		8.37 ± 0.04
pH in KCL solution		7.95 ± 0.04

**Table 1:** Characteristics of the soil subtract used for the planting of young beeches, before any N addition. Measurements were achieved from soil aliquots of five pots for the texture and from soil aliquots of nine pots for each other characteristics.

N treatment	Leaves		Current-year stems	
	N concentration	LMA	N concentration	SMA
T1	10.2 ± 0.13a	67.4 ± 0.76a	5.67 ± 0.20a	276.7 ± 7.90a
T2	17.2 ± 0.79b	72.1 ± 3.74a	10.1 ± 1.05b	307.9 ± 34.5a
T3	14.1 ± 1.27c	70.9 ± 3.07a	8.00 ± 0.81ab	294.7 ± 8.53a

**Table 2:** Mass-based N concentrations (mg g<sup>-1</sup>) and leaf or stem mass per area (LMA and SMA, g m<sup>-2</sup>) of leaves and current-year stems of *Fagus sylvatica* L. according to the three N treatments (T1, T2, and T3). Data are means ± SE with *n*=3. For each organ (leaves or stems), letters (*a*, *b*, and *c*) indicate significant differences between N treatments.



## Figures legends

**Figure 1:** Gas exchange of current-year stems of *Fagus sylvatica* L. measured as CO<sub>2</sub> efflux in the dark (dark respiration rate,  $R_d$ ), CO<sub>2</sub> efflux under saturated light ( $R_l$ ) and calculated rates of gross photosynthetic ( $P_g$ ), for each of the three N treatments (T1, T2, and T3). Data are means  $\pm$  SE, with  $n = 3$ . Letters (*a*, *b*, and *c*) indicate significant differences between N treatments, for each parameters ( $R_d$ ,  $R_l$  and  $P_g$ )

**Figure 2:** Relationship between area-based gross photosynthesis ( $P_g$ ) and area-based dark respiration rate ( $R_d$ ) of current-year stems of *Fagus sylvatica* L. trees subjected to the different nitrogen treatments. Each value corresponds to one of the three current-year stems sampled on each of the nine trees (three per N treatment).

**Figure 3:** Relationship between mass-based gross photosynthesis ( $P_g$ ) and mass-based nitrogen concentration of current-year stems of *Fagus sylvatica* L. trees subjected to the different nitrogen treatment. Each value corresponds to one of the three current-year stems sampled on each of nine trees (three per treatment).

**Figure 4:** Relationship between total soluble protein content and nitrogen concentration of leaves (black-filled circles) and current-year stems (open circles) of *Fagus sylvatica* L. Each point corresponds to the mean values of each N treatment and mean value of protein content ( $n=3$  for each ones). The standard errors of the ordinate and abscissa values are shown as vertical and horizontal bars, respectively.

**Figure 5:** Relationships between Rubisco and PEPC total activities and mass-based nitrogen concentration of leaves (black-filled circles) and current-year stems (open circles) of *Fagus sylvatica* L. Each point corresponds to the mean values of each N treatment and mean value of enzyme activity ( $n=3$  for each ones). The standard errors of the ordinate and abscissa values are shown as vertical and horizontal bars, respectively.

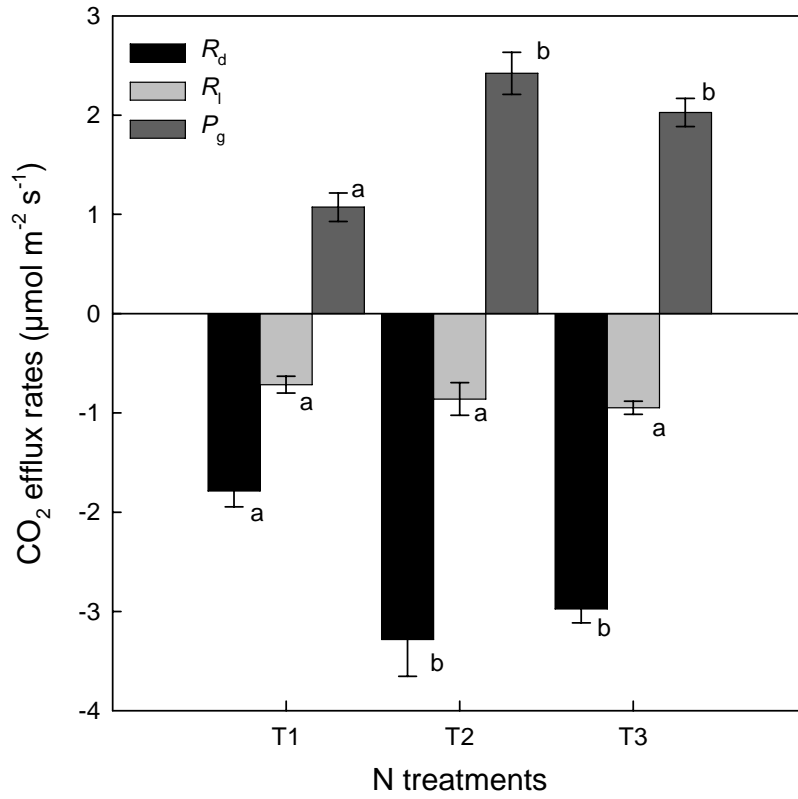


Figure 1

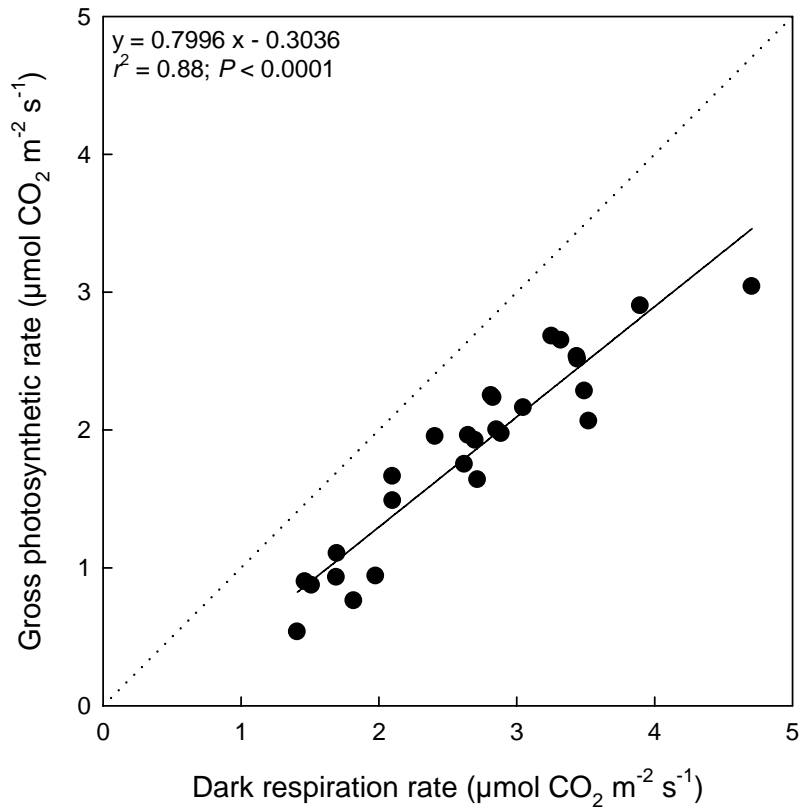


Figure 2

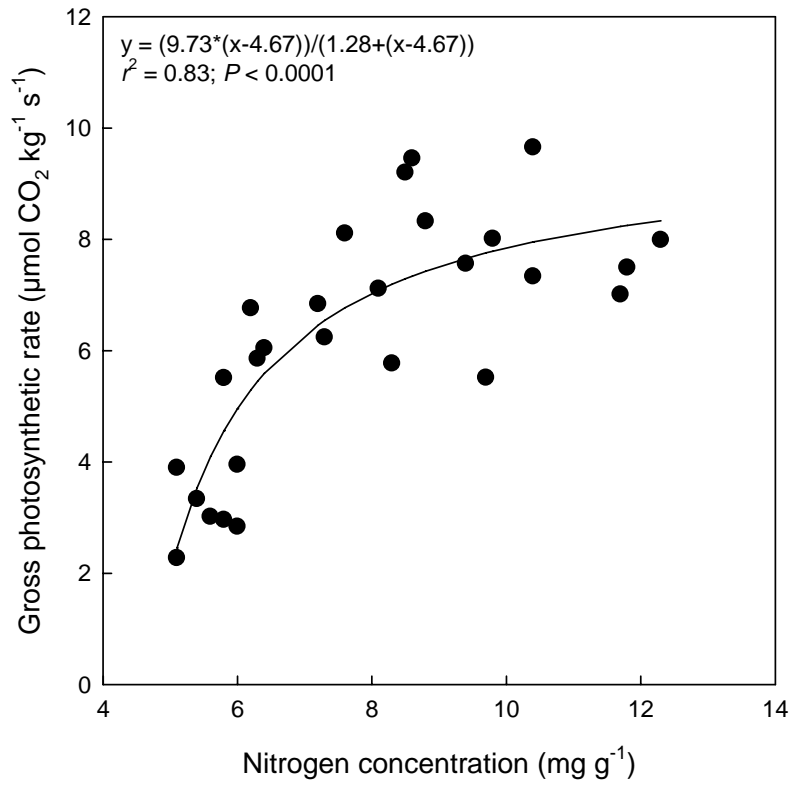


Figure 3

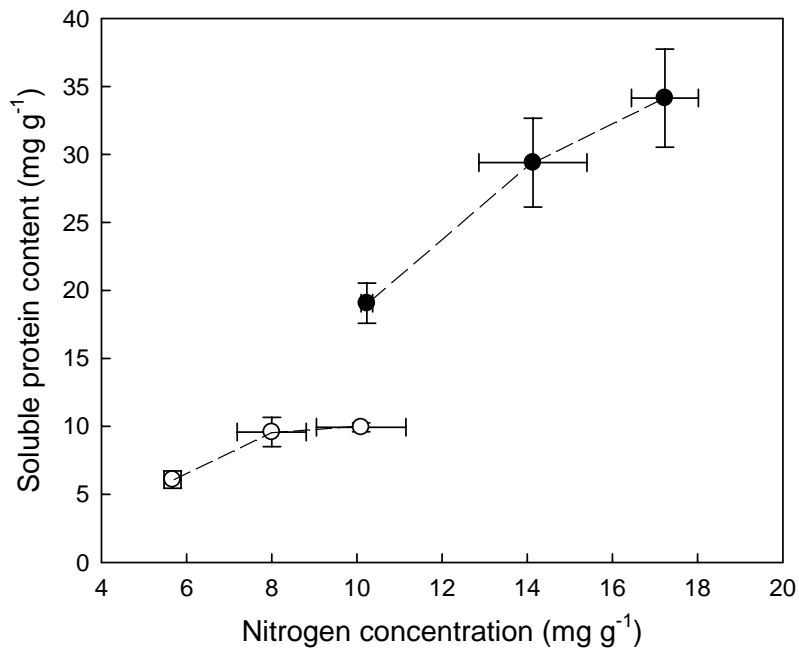


Figure 4

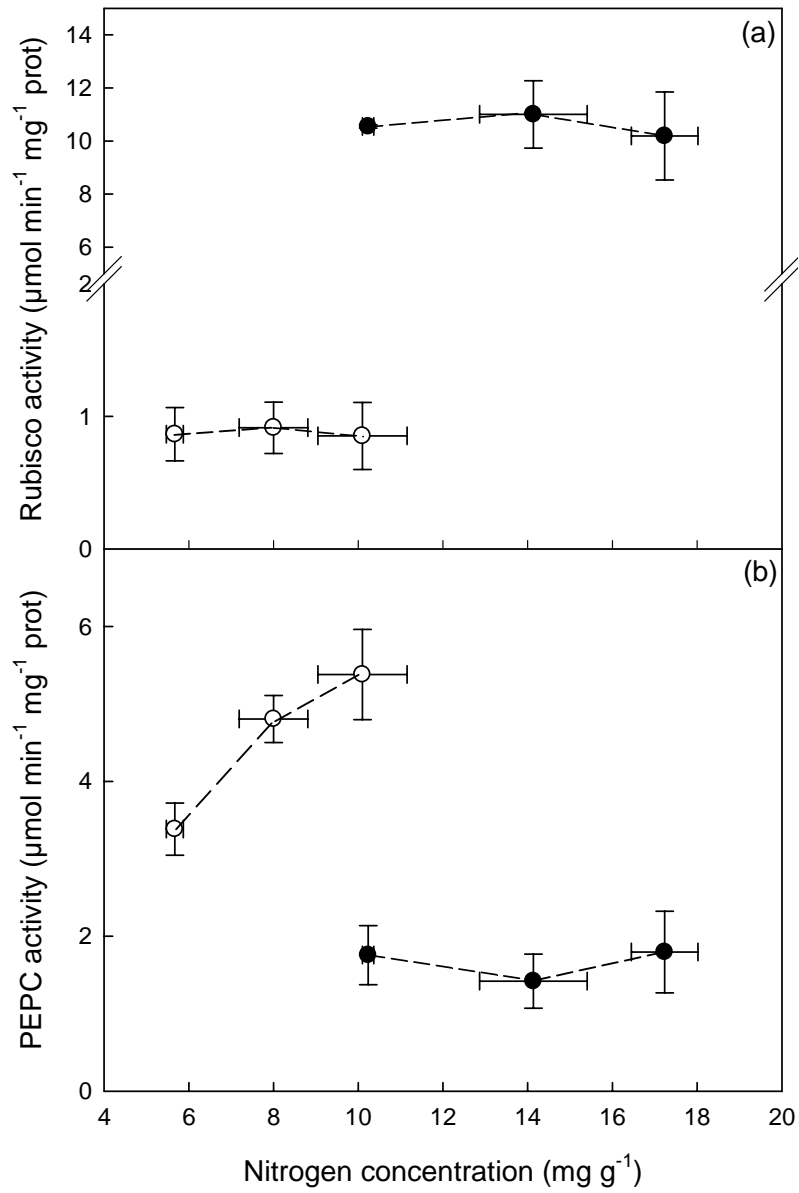


Figure 5



***VI) DISCUSSION GENERALE,  
CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES***

---



Le principal objectif de cette thèse était de caractériser la photosynthèse des tiges sous des aspects écophysologiques et biochimiques, points de vue qui avaient été jusqu'à présent peu considérés. Dans ce dernier chapitre, nous allons résumer l'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse en comparant notamment les données recueillies sur les tiges de hêtre, notre espèce modèle, avec celles des feuilles. L'ouverture et le prolongement du travail sont discutés autour de plusieurs perspectives pour lesquelles seront précisées des pistes de réflexion et d'expérimentation.

## COMPARAISON DE LA PHOTOSYNTHESE DES TIGES ET DES FEUILLES

L'assimilation de CO<sub>2</sub> par la photosynthèse foliaire représente la principale source de carbone de l'arbre. La feuille est un organe à durée de vie limitée et possédant des caractéristiques structurales spécifiques qui lui permettent notamment d'optimiser la capture de la lumière et l'absorption du CO<sub>2</sub>. La tige est, quant à elle, un organe pérenne qui compose le compartiment ligneux aérien de l'arbre. Ses fonctions principales sont (1) d'assurer le soutien aérien de l'individu, (2) de véhiculer les éléments minéraux provenant des racines et les sucres provenant des feuilles, (3) et de constituer un organe de réserve.

La photosynthèse des tiges de plantes herbacées (e.g. tabac, (Hibberd & Quick, 2002) et désertiques ou semi désertiques (e.g. genêt, (Nilsen & Semones, 1997) présente des caractères similaires aux feuilles avec la présence de stomates, une réponse quasi-identique aux facteurs environnementaux et pas ou peu d'écorce morte (Aschan & Pfanz, 2003). Bien que les cellules du xylème (rayons) possèdent de la chlorophylle, la photosynthèse des tiges des arbres est souvent appelée "photosynthèse corticale" car la majorité du tissu chlorophyllien est situé en périphérie, dans le parenchyme cortical (Pfanz & Aschan, 2001). Sur le hêtre, en comparant les traits structuraux des tiges à ceux des feuilles, on constate que la tige des arbres ligneux est peu optimisée pour la fonction de photosynthèse (**tableau 5** et voir **chapitre II**). En effet, sa forte masse surfacique, son fort rapport surface sur volume et l'augmentation de l'épaisseur de l'écorce au cours de la croissance de la tige freine la diffusion des gaz et la transmission de lumière jusqu'aux tissus photosynthétiques.

Caractéristiques		Feuille		Tige de l'année		
		saison	juin - juillet	saison	juin - juillet	
Traits structuraux	Masse surfacique (g m <sup>-2</sup> )	50 – 110	110	110 – 610	350	
	Rapport poids sec / poids frais	0.3 – 0.6	0.5	0.2 – 0.6	0.5	
	Contenu en azote (mg g <sup>-1</sup> )	6.9 – 43	22	6.5 – 37	10	
	Contenu en chlorophylle (µmol g <sup>-1</sup> )	0.1 – 5.0	3.8	0.4 – 2.1	0.9	
	Rapport Chl a / Chl b	2.7 – 3.8	3.8	1.9 – 2.5	2.0	
Traits d'échanges gazeux	Respiration	Surface (µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	1.0 – 3.0	1.0	0.7 – 5.0	2.0
		Masse (µmol kg <sup>-1</sup> MS s <sup>-1</sup> )	20 – 30	10	2.0 – 45	7.0
	Photosynthèse brute	Surface (µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	3.0 – 12	12	0.3 – 4.0	1.0
		Masse (µmol kg <sup>-1</sup> MS s <sup>-1</sup> )	30 – 130	130	1.0 – 32	2.9
	$F_v / F_m$		0.7 – 0.8	0.8	0.6 – 0.8	0.78
Traits biochimiques	Activité tot. Rubisco (nmol CO <sub>2</sub> s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot)	4.0 – 13	13	0.7 – 1.9	1.0	
	Activité PEPC (nmol HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot)	0.3 – 1.9	0.4	1.1 – 2.3	1.3	

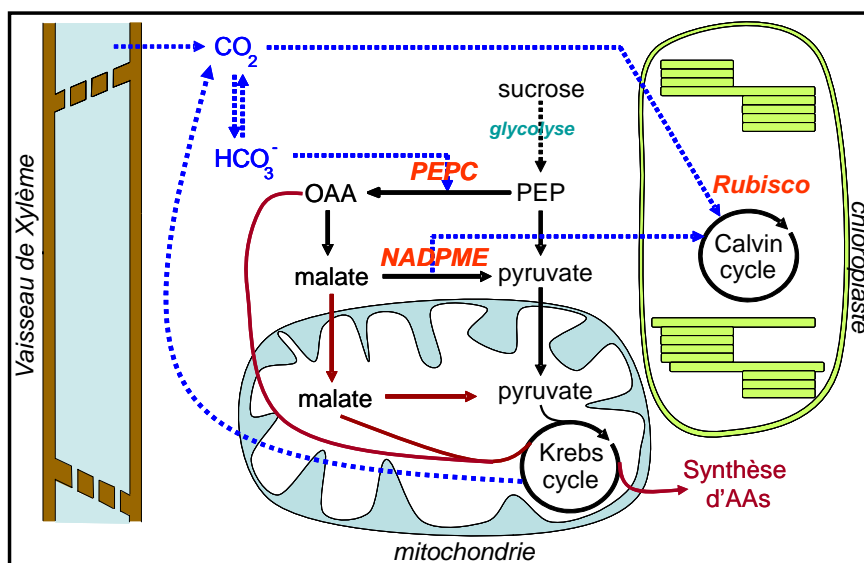
Tableau 5 : gammes de variations sur la saison de végétation (saison) et valeurs d'été (juin - juillet) de plusieurs traits écophysologiques mesurés sur les feuilles et tiges de l'année de hêtre au cours de cette étude.



La tige possède de la chlorophylle mais également toute la machinerie photosynthétique nécessaire à la photosynthèse (voir **chapitre I**). La feuille présente généralement une assimilation nette positive alors que, dans la plupart des cas, la tige ne fait que "refixer" une partie du carbone perdu par respiration (Cernusak & Marshall, 2000; Pfnz *et al.*, 2002). Chez le hêtre, c'est en début de croissance que la tige présente une photosynthèse relativement importante avec une quantité maximale de chlorophylle (la feuille n'étant pas encore totalement développée) et une compensation totale, en instantanée, des pertes respiratoires (taux de refixation égal à 100%, voir **chapitre III**). En effet, à ce stade de croissance, l'écorce n'est pas ou peu développée et les tissus chlorophylliens sont distribués sur toute la section de la tige. Même si elle est quelque peu altérée, la lumière pénètre plus profondément et peu donc atteindre tous les tissus potentiellement photosynthétiques.

La tige est un organe pérenne alors que la feuille a une durée de vie classiquement comprise entre un an (pour la majorité des arbres caducifoliés) et quatre-cinq ans (pour les espèces sempervirentes à nos latitudes). Les feuilles atteignent leur optimum de photosynthèse lorsque leur masse surfacique est maximale, i.e. après le débourrement, puis l'assimilation de carbone décroît lentement jusqu'à la sénescence puis la chute des feuilles qui, chez le hêtre, a lieu au mois de novembre. Les tiges de l'arbre se retrouvent alors dépourvues de leur feuille et l'environnement lumineux change. Pendant la phase hivernale, Damesin (2003) a calculé un taux de refixation supérieur à 100 % ce qui signifie que la tige a réalisé une assimilation nette de CO<sub>2</sub> ; nous avons confirmé cette observation sur d'autres espèces comme l'aune, le bouleau et le frêne (voir **chapitre II**). Ce gain supplémentaire de carbone en hiver peut être bénéfique pour l'arbre, notamment pour l'entretien des tissus et des réserves protéiques accumulées pendant la phase de sénescence foliaire (remobilisation de l'azote des feuilles vers les tiges). Pour les arbres vivants en conditions désertiques (e.g. genres *Acacia* et *Cercidium*) et possédant de petites feuilles, la contribution de la photosynthèse des tiges pour la croissance et la survie de la plante est supposée être importante (Adams *et al.*, 1967; Schaedle, 1975).

La photosynthèse des plantes en C<sub>3</sub> est caractérisée par l'utilisation de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase 5 (Rubisco) comme première enzyme fixatrice de CO<sub>2</sub>. Cette enzyme est très abondante dans les feuilles. Puisque la tige est capable de photosynthétiser, il n'est donc pas surprenant que la Rubisco ait été détectée dans cet organe. Les résultats de cette thèse montrent qu'elle est présente dans la tige tout au long de la saison de végétation chez le hêtre mais également dans les tiges des autres espèces d'arbres étudiées (voir **chapitre III**). Alors que l'activité est similaire entre tige et feuille en début de saison, celle-ci reste quatre fois plus faible dans les tiges que dans les feuilles le reste de la saison.



**Figure 24** : schéma synthétique d'une cellule de tige indiquant les différentes voies possibles d'intégration du CO<sub>2</sub> dans le métabolisme carboné (en bleu) et impliquant les enzymes PEPC, Rubisco et NADP-ME. Notre hypothèse est que la PEPC fixe prioritairement le CO<sub>2</sub>. Ce dernier est ensuite libéré par la NADP-ME dans l'environnement proche de la Rubisco. Les flèches bordeaux indiquent la voie anaérobie.

En revanche, l'activité PEPC est plus forte dans la tige. Chez les plantes en  $C_3$ , comme c'est le cas du hêtre, cette enzyme intervient classiquement au niveau de la voie anaplérotique. Le fort rapport des activités PEPC / Rubisco, la forte activité NADP-ME et la configuration particulière des cellules photosynthétiques dans la tige laissent à penser qu'un métabolisme de type  $C_4$  pouvait avoir lieu. Les résultats publiés sur le tabac (Hibberd & Quick, 2002) ont également appuyé l'hypothèse qu'un métabolisme de type  $C_4$  puisse avoir lieu dans une plante  $C_3$ . Ces auteurs montrent que la tige de tabac assimile du  $CO_2$ , celui-ci ayant été préalablement fixé au niveau des racines, transporté par la sève xylémienne et libéré au niveau de la tige.

Dans la configuration de la tige de hêtre, les cellules chlorophylliennes étant généralement localisées en périphérie de la tige (chlorenchyme), notre hypothèse de départ était que la Rubisco soit localisée dans le chlorenchyme, et la PEPC proche du xylème où la concentration en  $CO_2$  est la plus forte. Le  $CO_2$  serait tout d'abord fixé par la PEPC en profondeur et puis alimenterait, via un transporteur (malate par exemple), la Rubisco située en périphérie, proche de la source lumineuse (**figure 24**). Nos résultats indiquent que la PEPC possède toutes les caractéristiques d'une PEPC de plantes en  $C_3$  et que PEPC et Rubisco ne présentent pas de distribution différentielle particulière dans la jeune tige de hêtre (voir **chapitre IV**).

Cependant, nous nous sommes penchés sur une période particulière de croissance de la tige, i.e. quelques jours après le débourrement. Avec l'âge, la photosynthèse des tiges devient de plus en plus négligeable face à l'efflux respiratoire (Aschan *et al.*, 2001). Comme la structure de la tige évolue au cours du temps et que les tissus photosynthétiques se retrouvent de plus en plus en périphérie, il est possible que le métabolisme soit modifié, et ce d'autant plus que les conditions environnantes changent (moins de lumière, plus de  $CO_2$ , influence de plus en plus importante du flux de sève sur les flux de  $CO_2$ ).

De plus, il faut savoir que la PEPC est une enzyme susceptible de fonctionner à l'obscurité. La régulation de l'activité PEPC est liée à une kinase (PEPC kinase) qui s'active à la lumière. L'activation de la PEPC par la PEPC kinase est plus importante chez les plantes  $C_4$  que chez les plantes  $C_3$  pour lesquelles les différences d'activité entre lumière et obscurité sont faibles. Il serait toutefois intéressant de mesurer l'activité PEPC sur des tiges prélevées à l'obscurité afin de connaître la capacité de la tige à refixer du  $CO_2$  à l'obscurité.

## ASPECTS ECOLOGIQUES ET EVOLUTIFS DE LA PHOTOSYNTHESE DES TIGES

Au vu des résultats présentés dans les **chapitres II et V**, la tige possède des caractéristiques similaires aux feuilles, non pas en terme de valeurs absolues mais en terme de réponse de la photosynthèse aux contraintes environnementales (température, éclairage, contenu en azote, contenu en chlorophylle). L'existence de ces relations suppose que l'assimilation de carbone par la tige n'est pas "simplement" une fonction qui se maintiendrait à un niveau de base et nous suggérons que la coordination entre les traits mesurés chez la tige est le résultat d'une sélection ancestrale ayant eu lieu lorsque les tiges étaient le principal organe de la plante à assimiler le carbone. Les données paléontologiques suggèrent effectivement que la fonction de photosynthèse est apparue initialement sur les organes faisant office de support de la plante (les tiges) longtemps avant l'apparition sur des organes spécialisés (les feuilles). Par exemple, la lignée entièrement fossile des Rhyniophytes comprend une plante la plus ancienne connue à ce jour, la *Cooksonia* qui mesure environ 6,5 cm de hauteur (-420 MA, fin du Silurien) ; cette plante est composée uniquement d'axes ramifiés, possédant des stomates et assurant la photosynthèse (Raven *et al.*, 2000).

A priori, il n'existe pas d'étude ayant fait l'objet d'un travail sur la conservation de la fonction d'assimilation de carbone sur des organes autres que les feuilles, i.e. tiges, fruits, fleurs, chez les plantes ligneuses. D'après Erika J. Edwards (Yale University, comm. pers.), il y a eu certainement un nombre important de "gains" et de "pertes" dans l'expression de la photosynthèse des tiges au sein de la plante toute entière, et ceci est probablement lié à des situations complexes dans lesquelles différents gènes se sont ou non exprimés. Une approche phylogénétique utilisant des approches comparatives permettrait peut-être de comprendre pourquoi la photosynthèse des tiges a été maintenue au cours de l'évolution et comment les traits fonctionnels liés à la photosynthèse des tiges ont évolué.

D'un point de vue écologique, on peut rencontrer différents cas de plantes où la fonction de photosynthèse des tiges est plus ou moins importante. Certaines plantes, survivantes de groupes fossiles (e.g. Ephedraceae, Psilotaceae), emploient quasi exclusivement la photosynthèse des tiges comme entrée de carbone dans la plante (Nilsen, 1995). D'autres plantes ne possèdent pas du tout de chlorophylle. C'est le cas par exemple d'un mutant naturel d'une espèce d'orchidée, *Cephalanthera damasonium* (photo ci-contre). Contrairement au monotrope<sup>8</sup> qui possède de toutes petites feuilles, ce mutant de *C. damasonium* produit des feuilles développées tout en étant dépourvues de chlorophylle. Dans ce cas, l'acquisition de carbone opère par l'intermédiaire de champignons mycorhiziens associés entre la plante albinos dite myco-hétérotrophe<sup>9</sup> et une autre plante photosynthétique (Julou *et al.*, 2005).



Le cas précédent montre que des plantes peuvent perdre la capacité à synthétiser de la chlorophylle et à photosynthétiser. On peut alors se demander pourquoi les tiges des arbres n'ont pas aussi perdu la capacité de photosynthétiser (sachant que les feuilles assurent l'entrée de carbone). Peut-être est-il impossible qu'une partie seulement de la plante perde cette capacité ? En terme d'investissement énergétique, la fonction de photosynthèse des tiges représente probablement un coût non négligeable pour la plante. Si tel est le cas, on peut penser que le maintien de la photosynthèse dans la tige représente réellement un gain pour la plante. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'établir le rapport coûts / bénéfices de la photosynthèse des tiges et de l'examiner en fonction des conditions environnementales et des contraintes du milieu. Selon l'écosystème (e.g. forêt, prairie, steppe, désert, ...), le climat (e.g. tempéré, boréal, tropical), le microenvironnement (e.g. lumineux, ombragé) et le type d'espèce rencontrée (e.g. espèce pionnière ou tardive ; espèce d'ombre ou de lumière), il est possible que la plante ligneuse investisse plus ou moins de ressources dans la photosynthèse des tiges.

## SOURCE ET DEVENIR DU CARBONE ASSIMILÉ PAR LA TIGE LIGNEUSE

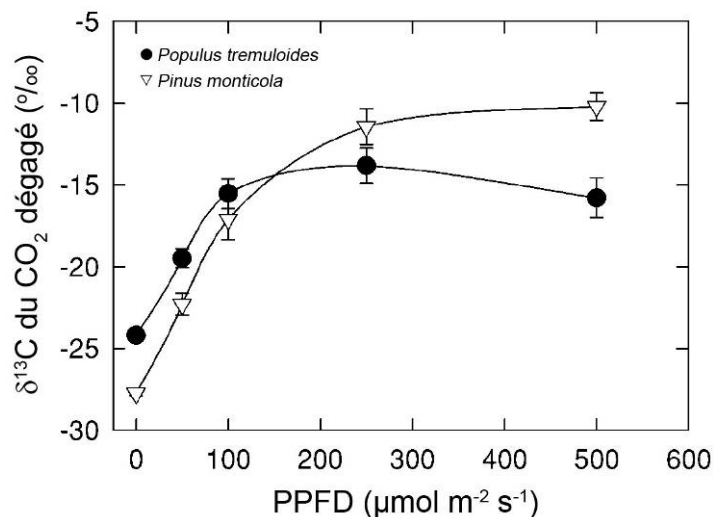
Comme spécifié dans le **chapitre I (figure 5)**, les sources de CO<sub>2</sub> sont connues au niveau de la tige. La majeure partie du CO<sub>2</sub> provient de la respiration des tissus vivants en place. Au cours de la croissance de la tige (augmentation du diamètre), la proportion en masse des tissus vivants diminue très fortement les premières années, passant de 100 % à 30 %, puis reste relativement stable ensuite à environ 20 % (Ceschia, 2001). La proportion du xylème qui véhicule une grande part du CO<sub>2</sub> respiré par les tissus sous jacents devient alors importante et influence l'efflux de CO<sub>2</sub> mesuré (Teskey *et al.*, 2008).

Bien que la source de CO<sub>2</sub> réassimilée par la photosynthèse des tiges n'ait pas été clairement identifiée, le CO<sub>2</sub> semble être principalement issu de la respiration des tissus de la tige, notamment les tissus vivants en périphérie. Une expérience utilisant les isotopes stables comme traceur naturel de carbone a permis de répondre en partie à cette question et de connaître de façon plus fine la source et le devenir du carbone assimilé par la tige (Cernusak *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que, chez le peuplier (et le pin), la signature isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) du CO<sub>2</sub> respiré par la tige passait de -24.2 ‰ (-27.7 ‰) à l'obscurité, une valeur classiquement observée sur les tiges d'espèces ligneuses (e.g. (Damesin & Lelarge, 2003), à -15.8 ‰ (-10.2 ‰) à la lumière (**figure 25**).

<sup>8</sup> Monotrope : genre de plante de la famille des Ericacées, dépourvues de chlorophylle et vivant en sous bois de forêts denses.

<sup>9</sup> Myco-hétérotrophe : se dit d'une plante incapable d'effectuer la photosynthèse et recevant sa matière carbonnée de ses champignons mycorhiziens.

Nous confirmons cette observation sur le hêtre pour lequel le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par les tiges de l'année de hêtre passe de -23.5 ‰ à l'obscurité à -15.8 ‰ à la lumière (PPFD = 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Comme c'est le cas classiquement chez les feuilles, la photosynthèse des tiges discrimine donc contre le  $^{13}\text{C}$  : à la lumière, la matière organique s'appauvrit en  $^{13}\text{C}$  et le  $\text{CO}_2$  "non fixé" (et respiré) est enrichi en  $^{13}\text{C}$ .



**Figure 25** : signature isotopique du  $\text{CO}_2$  dégagé par les tiges de peuplier (*Populus tremuloides*) et de pin (*Pinus monticola*) en fonction de la lumière incidente (PPFD). D'après Cernusak et al. (2001).

Les auteurs de cette étude montrent également que le  $\text{CO}_2$  respiré par les tiges à l'obscurité, après deux à trois heures d'illumination, est appauvri en  $^{13}\text{C}$  suggérant que les photosynthétats produits pendant la phase lumineuse sont "respirés" dès que la tige est replongée dans l'obscurité. Enfin, en supprimant artificiellement la photosynthèse des tiges (exclusion lumineuse pendant quatre mois) il s'avère que le  $\text{CO}_2$  respiré s'enrichit (de 2.5 ‰), mais également la matière organique totale de l'écorce (de 0.6 ‰) et du bois (de 0.8 ‰). Cela montre que la photosynthèse des tiges influence directement la signature isotopique des tissus qui composent la tige.

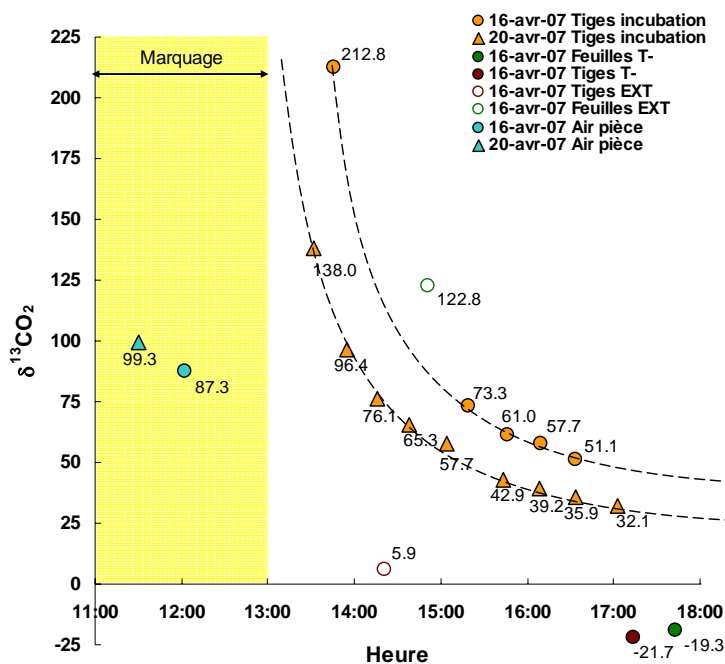
Afin de savoir si la tige est capable d'assimiler directement du  $\text{CO}_2$  atmosphérique, nous avons réalisé une première expérience de marquage au cours de cette thèse en se focalisant sur les très jeunes tiges de hêtre dont on sait qu'elles présentent, à ce stade, le plus fort taux de photosynthèse brute (voir **chapitre III**). C'est également à ce stade que l'on a le plus de chance d'observer une assimilation nette de  $\text{CO}_2$  dans la tige.

Dans ce contexte, nous avons utilisé un appareil d'échange gazeux LiCor-6400 relié à une "conifer chamber". Entre six et huit tiges de l'année ont été disposées dans la chambre (**figure 26**) et nous avons réalisé un marquage au  $^{13}\text{CO}_2$  (99 ‰, 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) sous éclairage saturant (PPFD = 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), à 25°C et 50 % d'humidité relative, pendant trois heures.

Après le marquage, les portions de tiges de la chambre ont été isolées du reste des tiges puis placées dans un système fermé d'échange gazeux relié à un IRGA (EGM-4, PP Systems). Nous avons alors suivi la signature du  $\text{CO}_2$  respiré à l'obscurité dans les heures qui ont suivi le marquage (**figure 27**).



**Figure 26** : tiges de l'année de hêtre positionnées dans la "conifer-chamber" du LiCor 6400 en vue du marquage au  $^{13}\text{CO}_2$ .



**Figure 27** : signatures isotopiques des différentes sources d'air prélevées pendant et après le marquage au  $^{13}\text{CO}_2$  à deux dates différentes (16-avr-07, cercles et 20-avr-07, triangles). Le marquage a commencé à 11:00 et s'est terminé à 13:00. Le  $\delta^{13}\text{C}$  a été mesuré sur des prélèvements d'air de la pièce pendant le marquage (symboles bleus), toutes les demi-heures sur le  $\text{CO}_2$  respiré par les tiges de la chambre après le marquage (symboles oranges), sur le  $\text{CO}_2$  respiré par les feuilles (cercle ouvert vert) et les tiges (cercle ouvert marron) situées à l'extérieur de la chambre vers la partie apicale et, enfin, sur des feuilles (cercle plein vert) et des tiges (cercle plein marron) témoins, n'ayant pas subi de marquage.

Nous remarquons que l'air de la pièce était marqué (symboles bleus). En effet, l'air du LiCor 6400 était éjecté juste sous la chambre, polluant malheureusement l'air de la pièce. Malgré tout, ces premiers résultats indiquent que la tige est susceptible d'assimiler le  $\text{CO}_2$  ambiant puisque les signatures isotopiques du  $\text{CO}_2$  respiré par les tiges 30 min. après le marquage (212.8 ‰ le 16-avr-07 et 138.0 ‰ le 20-avr-07) dépassent celles du  $\text{CO}_2$  de l'air ambiant (87.3 ‰ le 16-avr-07 et 99.3 ‰ le 20-avr-07). Au cours des quatre heures qui ont suivi le marquage, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par les tiges a diminué progressivement pour atteindre 32.1 ‰ quatre heures après le marquage (à environ 17:00 le 20-avr-2007). D'autre part, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par les feuilles situées à l'extérieur de la tige en position apicale (122.8 ‰) dépassait également celle du  $\text{CO}_2$  de l'air ambiant. Il se pourrait donc que du  $\text{CO}_2$  ayant été assimilé par les tiges dans la chambre ait été respiré par les feuilles situées plus haut, en position apicale.

Bien que l'on ne puisse totalement conclure, cette expérience suggère que la tige ne refixe pas uniquement son propre  $\text{CO}_2$  respiré mais qu'elle est aussi capable d'assimiler du  $\text{CO}_2$  atmosphérique. De plus, les sucres (ou indirectement le  $\text{CO}_2$ ) issus de cette assimilation seraient transportés via le flux de sève xylémienne pour alimenter les feuilles situées en position apicale. D'autres expérimentations sont nécessaires pour confirmer ces résultats. En s'assurant de l'absence d'une pollution de l'air au  $^{13}\text{CO}_2$ , ces marquages pourront être renouvelés en utilisant un spectromètre laser (TDLS, Campbell Sci.) pour suivre, en continu, les concentrations en  $^{12}\text{CO}_2$  et en  $^{13}\text{CO}_2$  respiré par les tiges. En suivant la signature isotopique du  $\text{CO}_2$  respiré par la tige pendant les heures voire les jours qui suivent le marquage, nous pourrions calculer le temps de résidence du carbone assimilé, savoir quels sont les pools de carbone influencés par les produits de la photosynthèse des tiges : est ce que ce carbone est stocké, e.g. sous forme d'amidon ? Est-il transporté directement vers les autres organes en croissance ? Est-il totalement ou en partie respiré par la tige ? Si le carbone est stocké sous forme d'amidon, l'utilisation de la microscopie SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) pourrait nous permettre de localiser le carbone marqué.

## CONCLUSION

Les échanges gazeux mesurés sur le hêtre et plusieurs autres espèces d'arbres au cours de cette étude révèlent que la photosynthèse des tiges présente des caractéristiques proches de la photosynthèse des feuilles, non pas en terme de valeur absolue mais en terme de réponses positives à l'éclairement et



aux concentrations en chlorophylle et en azote. La machinerie photosynthétique est intacte et les cellules chlorophylliennes ne montrent pas de distribution préférentielle dans la jeune tige. Sur une saison de végétation, la jeune tige de hêtre présente le maximum de photosynthèse peu après le débourrement, lorsque le suber n'est pas encore bien développé. La Rubisco est présente dans la tige mais son activité est faible en comparaison avec la feuille. En revanche, l'activité PEPC est très importante dans la tige ce qui suggère que l'assimilation de carbone peut avoir lieu à l'obscurité. Les forts rapports des activités PEPC/Rubisco mesurés sur la jeune tige pouvaient suggérer l'existence d'un métabolisme de type  $C_4$  dans la tige. En utilisant les techniques spectrophotométriques et immunocytochimiques (par microscopie électronique), nous avons montré que la PEPC de la tige de hêtre est typique de celle d'une plante à métabolisme  $C_3$  et que Rubisco et PEPC ne présentent pas de distribution différentielle dans la tige. L'absence de séparation spatiale des processus photochimiques impliquant la Rubisco et des processus de capture du  $CO_2$  impliquant la PEPC confirme qu'un métabolisme  $C_4$  n'a pas lieu dans la tige, aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle de l'organe. Il n'empêche que la tige investit plus d'énergie que la feuille dans la PEPC dont le rôle principal connu chez les plantes à métabolisme  $C_3$  est notamment de fournir des squelettes carbonés supplémentaires au cycle de Krebs lorsqu'il est en partie dérouté vers la synthèse d'acides aminés liée à l'assimilation d'azote. Nous avons pu montrer que l'augmentation d'azote dans le sol stimule la photosynthèse des tiges, i.e. augmentation de la refixation de  $CO_2$ , et stimule l'activité PEPC alors que la Rubisco semble être insensible. La PEPC, située à une position charnière dans le métabolisme carboné, semble donc jouer un rôle important dans la photosynthèse des tiges.

Les expériences qui ont été menées au cours de cette thèse nous ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de la photosynthèse des tiges, notamment au niveau biochimique et écophysio-logique, aspects jusqu'à présent peu étudiés. Plusieurs pistes d'études très intéressantes sont encore à approfondir. D'un point de vue physiologique, le devenir du  $CO_2$  assimilé par la tige n'a pour l'instant pas été déterminé et il serait intéressant de connaître sa voie d'incorporation dans le métabolisme carboné de la tige et de l'arbre. Cette perspective pourra être réalisée prochainement en utilisant les techniques de marquages au  $^{13}C$  déjà lancées au cours de cette thèse. D'un point de vue écologique, une approche utilisant des données d'espèces d'habitats variés permettrait de d'examiner l'importance de la photosynthèse des tiges en fonction de l'écosystème étudié et de ses contraintes environnementales. Enfin, en terme de bilan carboné, il serait intéressant de déterminer à l'échelle de la plante ou de l'écosystème, la quantité de carbone assimilée, refixée et remobilisée par la photosynthèse des tiges, ce qui permettrait de savoir si ce flux joue un rôle négligeable ou non et ce, en fonction des différentes périodes de l'année.



## ***VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---





- Adams MS, Strain BR, Ting IP. 1967.** Photosynthesis in chlorophyll stem tissue and leaves of *Cercidium floridum*: accumulation and distribution of  $^{14}\text{C}$  from  $^{14}\text{CO}_2$ . *Plant Physiology* **42**(12): 1797-1799.
- Alessio GA, Pietrini F, Brilli F, Loreto F. 2005.** Characteristics of  $\text{CO}_2$  exchange between peach stems and the atmosphere. *Functional Plant Biology* **32**(9): 787-795.
- Ames IH, Tepper HB. 1978.** Seasonal changes in the ultrastructure of aspen bark chloroplasts. *Photosynthetica* **12**(1): 70-72.
- Arrhenius S. 1889.** Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **4**: 226-248.
- Aschan G, Pfanz H. 2003.** Non-foliar photosynthesis - a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* **198**: 81-97.
- Aschan G, Wittmann C, Pfanz H. 2001.** Age-dependent bark photosynthesis of aspen twigs. *Trees-Structure and Function* **15**: 431-437.
- Ashworth EN, Stirm VE, Volenec JJ. 1993.** Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. *Tree Physiology* **13**(4): 379-388.
- Atkin OK, Evans JR, Ball MC, Lambers H, Pons TL. 2000.** Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiology* **122**(3): 915-924.
- Bancal P, Soltani F. 2002.** Source-sink partitioning. Do we need Münch? *Journal of Experimental Botany* **53**(376): 1919-1928.
- Barbaroux C. 2002.** *Analyse et modélisation des flux de carbone de peuplements forestiers pour la compréhension de la croissance de deux espèces feuillues Quercus petraea et Fagus sylvatica.* Université Paris-Sud Orsay.
- Barbaroux C, Breda N. 2002.** Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. *Tree Physiology* **22**(17): 1201-1210.
- Barbaroux C, Breda N, Dufrene E. 2003.** Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* **157**(3): 605-615.
- Bazzaz FA 1997.** Allocation of resources in plants: state of the science and critical questions. In: J. Grace, ed, *Plant Resource Allocation*. San Diego, CA: Academic Press, 1-37.
- Bazzaz FA, Carlson RW. 1979.** Photosynthetic contribution of flowers and seeds to reproductive effort on an annual colonizer. *New Phytologist* **82**: 223-232.
- Bazzaz FA, Carlson RW, Harper JL. 1979.** Contribution to reproductive effort by photosynthesis of flower and fruits. *Nature* **279**: 554-555.
- Bligny R, Gout E, Kaiser W, Heber U, Walker D, Douce R. 1997.** pH regulation in acid-stressed leaves of pea plants grown in the presence of nitrate or ammonium salts: studies involving

- 31P-NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1320**(2): 142-152.
- Bowman WP, Barbour MM, Turnbull MH, Tissue DT, Whitehead D, Griffin KL. 2005.** Sap flow rates and sapwood density are critical factors in within- and between-tree variation in CO<sub>2</sub> efflux from stems of mature *Dacrydium cupressinum* trees. *New Phytologist* **167**(3): 815-828.
- Brooks A, Farquhar GD. 1985.** Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* **165**(3): 397-406.
- Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL. 2002.** *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland USA: American Soc. of Plant Physiologists.
- Buchel HB, Grosse W. 1990.** Localization of the porous partition responsible for pressurized gas-transport in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Tree Physiology* **6**(3): 247-256.
- Buns R, Acker G, Beck E. 1993.** The plastids of the yew tree (*Taxus baccata* L.): ultrastructure and immunocytochemical examination of chloroplastic enzymes. *Botanica Acta* **106**: 32-41.
- Cannon W. 1905.** On the transpiration of *Fouquieria splendens*. *Bull Torrey Bot Club* **32**: 397-414.
- Cannon W. 1908.** The topography of the chlorophyll apparatus in desert plants. *Carnegie Institution Washington Publication* **98**.
- Cernusak LA, Hutley LB, Beringer J, Tapper NJ. 2006.** Stem and leaf gas exchange and their responses to fire in a north Australian tropical savanna. *Plant, Cell and Environment* **29**: 632-646.
- Cernusak LA, Marshall JD. 2000.** Photosynthetic refixation in branches of Western Pine. *Functional Ecology* **14**: 300-311.
- Cernusak LA, Marshall JD, Comstock JP, Balster NJ. 2001.** Carbon isotope discrimination in photosynthetic bark. *Oecologia* **128**(2): 24-35.
- Ceschia E. 2001.** *Environmental effects on spatial and seasonal variations of stem respiration in European beech and Norway spruce*. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
- Chapin FS, Schulze E, Mooney HA. 1990.** The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**(1): 423-447.
- Chase WW. 1934.** *The composition, quantity, and physiological significance of gases in tree stems*. Minnesota Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 99. St Paul, MN, USA: University of Minnesota.
- Coe JM, McLaughlin SB. 1980.** Winter season corticular photosynthesis in *Cornus florida*, *Acer rubrum*, *Quercus alba*, and *Liriodendron tulipifera*. *Forest Science* **26**: 561-566.
- Damesin C. 2003.** Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance. *New Phytologist* **158**(3): 465-475.

- Damesin C, Ceschia E, Le Goff N, Ottorini J-M, Dufrêne E. 2002.** Stem and branch respiration of beech: from tree measurements to estimations at the stand level. *New Phytologist* **158**(3): 159-172.
- Damesin C, Lelarge C. 2003.** Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant, Cell and Environment* **26**(2): 207-219.
- Eklund L. 1993.** Seasonal variations of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and ethylene in oak and maple stems. *Canadian Journal of Forest Research* **23**: 2608-2610.
- Ellis RJ. 1979.** The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* **4**(11): 241-244.
- Evans JR. 1989.** Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia* **78**(1): 9-19.
- Farquhar GD, Von Caemmerer S, Berry JA. 1980.** A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* **149**: 78-90.
- Field C, Mooney HA 1986.** The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: T. J. Givnish, ed, *On the economy of plant form and function*. Cambridge: Cambridge University Press, 25-55.
- Finlay RD, Ek H, Odham G, Suderstrom B. 1989.** Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytologist* **113**(1): 47-55.
- Foote KC, Schaedle M. 1976a.** Diurnal and seasonal patterns of photosynthesis and respiration by stems of *Populus tremuloides* Michx. *Plant Physiology* **58**: 651-655.
- Foote KC, Schaedle M. 1976b.** Physiological characteristics of photosynthesis and respiration in stems of *Populus tremuloides* Michx. *Plant Physiology* **58**: 91-94.
- Fukumorita T, Chino M. 1982.** Sugar, amino acid and inorganic contents in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology* **23**(2): 273-283.
- Gansert D, Burgdorf M. 2005.** Effects of xylem sap flow on carbon dioxide efflux from stems of birch (*Betula pendula* Roth). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **200**(5): 444-455.
- Gartner BL, Moore JR, Gardiner BA. 2004.** Gas in stems: abundance and potential consequences for tree biomechanics. *Tree Physiology* **24**(11): 1239-1250.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**(1): 87-92.
- Gessler A, Rennenberg H, Keitel C. 2004.** Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech - Evaluation of different methods of phloem sap

- collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. *Plant Biology* **6**(6): 721-729.
- Gessler A, Schneider S, Von Sengbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreutzer K, Rennenberg H. 1998.** Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist* **138**(2): 275-285.
- Gifford RM, Evans LT. 1981.** Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Annual Review of Plant Physiology* **32**(1): 485-509.
- Givnish TJ 1995.** Plant stems: biomechanical adaptation for energy capture and influence on species distribution. In: B. L. Gartner, ed, *Plant stems: physiology and functional morphology*. San Diego: Academic Press, 3-49.
- Glass ADM, Siddiqi MY 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. In: H. S. StrivastavaR. P. Singh, eds. *Nitrogen Nutrition in Higher Plants*. New Delhi: Associated Publishing Co., 21-56.
- Granier A, Ceschia E, Damesin C, Dufrene E, Epron D, Gross P, Lebaube S, Le Dantec V, Le Goff N, Lemoine D, Lucot E, Ottorini J-M, Pontailier J-Y, Saugier B. 2000.** The carbon balance of a young Beech forest. *Functional Ecology* **14**(3): 312-325.
- Han SS, Suzaki T. 1981.** Studies on the production and consumption of assimilates by trees (IX): Bark photosynthesis and dark respiration of young green stems and branches of *Fagus crenata* and *Quercus acutissima*. *Journal of the Japanese Forestry Society* **63**: 242-244.
- Hargrave KR, Kolb KJ, Ewers FW, Davis SD. 1994.** Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist* **126**(4): 695-705.
- Hari P, Nygren P, Korpilahti E. 1991.** Internal circulation of carbon within a tree. *Canadian Journal of Forest Research* **21**: 514-515.
- Hibberd JM, Quick WP. 2002.** Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants. *Nature* **415**: 451-454.
- Hoch G, Richter A, Korner C. 2003.** Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment* **26**(7): 1067-1081.
- Hoefnagel MHN, Atkin OK, Wiskich JT. 1998.** Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1366**(3): 235-255.
- Höll W. 1974.** Dark CO<sub>2</sub> fixation by cell-free preparations of the wood of *Robinia pseudoacacia*. *Canadian Journal of Botany* **52**: 727-734.
- Hoyaux J, Moureaux C, Tourneur D, Bodson B, Aubinet M. 2008.** Extrapolating gross primary productivity from leaf to canopy scale in a winter wheat crop. *Agricultural and Forest Meteorology* **148**(4): 668-679.
- Huppe HC, Turpin DH. 1994.** Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism in Plant and Algal Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**(1): 577-607.

- Ivanov AG, Krol M, Sveshnikov D, Malmberg G, Gardeström P, Hurry V, Öquist G, Huner NPA. 2006.** Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine. *Planta* **223**: 1165-1177.
- Jensen KF. 1967.** *Measuring oxygen and carbon dioxide in red oak trees*. US Forest Service Research Note NE-74. Upper Darby, PA, USA: USDA Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. 2005.** Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**(2): 639-653.
- Kaipainen LK, Sofronova GI, Hari P, E. YE. 1998.** The role of xylem in CO<sub>2</sub> exchange in *Pinus sylvestris* woody stems. *Russian Journal of Plant Physiology* **45**: 500-505.
- Karabourniotis G, Bornman JF, Nikolopoulos D. 2000.** A possible optical role of the bundle sheath extensions of the heterobaric leaves of *Vitis vinifera* and *Quercus coccifera*. *Plant, Cell & Environment* **23**(4): 423-430.
- Kauppi A. 1991.** Seasonal fluctuations in chlorophyll content in birch stems with special reference to bark thickness and light transmission, a comparison between sprouts and seedlings. *Flora* **185**: 107-125.
- Kharouk VI, Middleton EM, Spencer SL, Rock BN, Williams DL. 1995.** Aspen bark photosynthesis and its significance to remote sensing and carbon budget estimates in the boreal ecosystem. *Water Air and Soil Pollution* **82**: 483-497.
- Kotakis C, Petropoulou Y, Stamatakis K, Yiotis C, Manetas Y. 2006.** Evidence for active cyclic electron flow in twig chlorenchyma in the presence of an extremely deficient linear electron transport activity. *Planta* **225**(1): 245-253.
- Kozaki A, Takeba G. 1996.** Photorespiration protects C<sub>3</sub> plants from photooxidation. *Nature* **384**(6609): 557-560.
- Kramer PJ, Kozlowski TT. 1979.** *Physiology of woody plants*. London: Academic Press.
- Krause GH, Weis E. 1991.** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**(1): 313-349.
- Kreuzwieser J, Herschbach C, Stulen I, Wiersema P, Vaalburg W, Rennenberg H. 1997.** Interactions of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and L-glutamate with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport processes of non-mycorrhizal *Fagus sylvatica* roots. *Journal of Experimental Botany* **48**(7): 1431-1438.
- Krömer S. 1995.** Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**(1): 45-70.
- Langenfeld-Heyser R. 1989.** CO<sub>2</sub> fixation in stem slices of *Picea abies* (L.) Karst.: microautoradiographic studies. *Trees-Structure and Function* **3**: 24-32.
- Larcher W, Lutz C, Nagele M, Bodner M. 1988.** Photosynthetic functioning and ultrastructure of chloroplasts in stem tissues of *Fagus sylvatica*. *Journal of Plant Physiology* **132**(6): 731-737.

- Larsen P. 1936.** Regenererende Kulsyreassimilation hos askegrene. *Forstl Forsoegsvaes Dan* **14**: 13-52.
- Lee RB, Drew MC. 1989.** Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany* **40**(7): 741-752.
- Lemoine R. 2000.** Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**(1-2): 246-262.
- Lendzian KJ. 2006.** Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* **57**(11): 2535-2546.
- Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, Cretin C. 1994.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Science* **99**(2): 111-124.
- Levy PE, Meir P, Allen SJ, Jarvis PG. 1999.** The effect of aqueous transport of CO<sub>2</sub> in xylem sap on gas exchange in woody plants. *Tree Physiology* **19**(1): 53-58.
- Lichtenthaler HK, Meier D 1984.** Regulation of chloroplast photomorphogenesis by light intensity and light quality. In: R. J. Ellis, ed, *Chloroplast biogenesis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 261-281.
- Loreto F, Dimarco G, Tricoli D, Sharkey TD. 1994.** Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron-transport and alternative electron sinks of field-grown wheat leaves. *Photosynthesis Research* **41**(3): 397-403.
- MacDougal DT, Working EB. 1933.** *The pneumatic system of plants, especially trees*. Publication 441. Washington, DC, USA: Carnegie Institute of Washington.
- Madore M, Grodzinski B. 1984.** Effect of oxygen concentration on <sup>14</sup>C photoassimilate transport from leaves of *Salvia splendens* L. *Plant Physiology* **76**(3): 782-786.
- Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. 1997.** Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C<sub>4</sub>-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiology* **115**(4): 1681-1689.
- Mahli Y, Baldocchi DD, Jarvis PG. 1999.** The carbon balance of tropical, temperate and boreal forests. *Plant Cell and Environment* **22**: 715-740.
- Maier CA, Clinton BD. 2006.** Relationship between stem CO<sub>2</sub> efflux, stem sap velocity and xylem CO<sub>2</sub> concentration in young loblolly pine trees. *Plant, Cell and Environment* **29**(8): 1471-1483.
- Manetas Y. 2004.** Probing cortical photosynthesis through *in vivo* chlorophyll fluorescence measurements: evidence that high internal CO<sub>2</sub> levels suppress electron flow and increase the risk of photoinhibition. *Physiologia Plantarum* **120**(3): 509-517.
- Manetas Y, Pfanz H. 2005.** Spatial heterogeneity of light penetration through periderm and lenticels and concomitant patchy acclimation of cortical photosynthesis. *Trees-Structure and Function* **19**(4): 409-414.

- Marcelis LFM, Hofman-Eijer LRB. 1995.** The contribution of fruit photosynthesis to the carbon requirement of cucumber fruits as affected by irradiance, temperature and ontogeny. *Physiologia Plantarum* **93**: 476-783.
- McGuire MA, Cerasoli S, Teskey RO. 2007.** CO<sub>2</sub> fluxes and respiration of branch segments of sycamore (*Platanus occidentalis* L.) examined at different sap velocities, branch diameters, and temperatures. *Journal of Experimental Botany* **58**(8): 2159-2168.
- McGuire MA, Teskey RO. 2004.** Estimating stem respiration in trees by a mass balance approach that accounts for internal and external fluxes of CO<sub>2</sub>. *Tree Physiology* **24**: 571-578.
- Millard P. 1988.** The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell and Environment* **11**(1): 1-8.
- Moeller J. 1882.** *Anatomie der Baumrinden: vergleichende Studien*. New York: Berlin Heidelberg.
- Münch E. 1930.** *Die stoffbewegungen in der pflanze*. Jena: Gustav Fisher.
- Negisi K. 1979.** Bark respiration rate in stems segments detached from young *Pinus densiflora* trees in relation to velocity of artificial sap flow. *Journal of the Japanese Forestry Society* **61**: 88-93.
- Nilsen ET. 1992.** The influence of water stress on leaf and stem photosynthesis in *Spartium junceum* L. *Plant, Cell and Environment* **15**: 455-461.
- Nilsen ET. 1992.** Partitioning growth and photosynthesis between leaves and stems during nitrogen limitation in *Spartium junceum*. *American Journal of Botany* **79**(11): 1217-1223.
- Nilsen ET 1995.** Stem photosynthesis: extent, patterns, and role in plant carbon economy. In: B. Gartner, ed, *Stems and trunks in plant form and function*. San Diego: Academic Press, 223-240.
- Nilsen ET, Bao Y. 1990.** The influence of water stress on stem and leaf photosynthesis in *Glycine max* and *Spartium junceum* (Leguminosae). *American Journal of Botany* **77**(8): 1007-1015.
- Nilsen ET, Karpa D. 1994.** Seasonal acclimation of stem photosynthesis in two invasive, naturalized legume species from coastal habitats of California. *Photosynthetica* **30**(1): 77-90.
- Nilsen ET, Karpa D, Mooney HA, Field C. 1993.** Patterns of stem photosynthesis in two invasive legumes (*Spartium junceum*, *Cytisus scoparius*) of the California coastal region. *American Journal of Botany* **80**(10): 1126-1136.
- Nilsen ET, Meinzer FC, Rundel PW. 1989.** Stem photosynthesis in *Psoralea argyrea* (smoke tree) in the Sonoran desert of California. *Oecologia* **79**(2): 193-197.
- Nilsen ET, Rundel PW, Sharifi MR. 1996.** Diurnal gas exchange characteristics of two stem photosynthesizing legumes in relation to the climate at two contrasting sites in the California desert. *Flora* **191**: 105-116.
- Nilsen ET, Semones S. 1997.** Comparison of variance in quantitative growth and physiological traits between genets and ramets derived from an invasive weed, *Spartium junceum* (Fabaceae). *International Journal of Plant Science* **158**(6): 827-834.



- Nilsen ET, Sharifi MR. 1994.** Seasonal acclimation of stem photosynthesis in woody legume species from the Mojave and Sonoran deserts of California. *Plant Physiology* **105**(4): 1385-1391.
- Nilsen ET, Sharifi MR. 1997.** Carbon isotope composition of legumes with photosynthetic stems from mediterranean and desert habitats. *American Journal of Botany* **84**(12): 1707-1713.
- O'leary MH. 1982.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's review. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 397-315.
- Pate J, Shedley E, Arthur D, Adams M. 1998.** Spatial and temporal variations in phloem sap composition of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Oecologia* **117**(3): 312-322.
- Pearson LC, Lawrence DB. 1958.** Photosynthesis in aspen bark. *American Journal of Botany* **45**: 383-327.
- Peisker M, Apel H. 2001.** Inhibition by light of CO<sub>2</sub> evolution from dark respiration: comparison of two gas exchange methods. *Photosynthesis Research* **70**(3): 291-298.
- Pfanz H, Aschan G. 2001.** *The existence of bark and stem photosynthesis in woody plants and its significance for the overall carbon gain. An eco-physiological and ecological approach.* Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Pfanz H, Aschan G, Langenfeld-Heyser R, Wittmann C, Loose M. 2002.** Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* **89**(4): 147-162.
- Pfanz H, Aschan G, Wittmann C 2000.** Bark Photosynthesis: Fact-not Fiction. In: M. Labrecque, ed, *L'arbre 2000*. Montreal, Canada: Isabell Quentin Publishers, 117-121.
- Portis AR. 1992.** Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**(1): 415-437.
- Pruyn ML, Gartner BL, Harmon ME. 2002.** Within-stem variation of respiration in *Pseudotsuga menziesii* (Douglas-fir) trees. *New Phytologist* **154**(2): 359-372.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2000.** *Biologie Végétale*. Paris: De Boeck Université.
- Reeke EG, Bazzaz FA. 1987.** Reproductive efforts in plants. I. Carbon allocation to reproduction. *American Naturalist* **129**: 876-896.
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS. 1997.** From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**(25): 13730-13734.
- Rennenberg H, Schneider S, Weber P. 1996.** Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field. *Journal of Experimental Botany* **47**(10): 1491-1498.
- Ryan MG. 1990.** Growth and maintenance respiration in stems of *Pinus contorta* and *Picea engelmannii*. *Canadian Journal of Forest Research* **20**(1): 48-57.
- Ryan MG. 1991.** Effects of climate on change on plant respiration. *Ecological Applications* **1**(2): 157-167.

- Ryan MG. 1995.** Foliar maintenance respiration of sub-alpine and boreal trees and shrubs in relation to nitrogen-content. *Plant Cell and Environment* **18**(7): 765-772.
- Sauter JJ. 1988.** Temperature-induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis* 'robusta'. *Journal of Plant Physiology*(132): 608-612.
- Sauter JJ, Wellenkamp S. 1998.** Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the twig wood of *Salix caprea* L. *Holzforschung* **52**(3): 255-262.
- Saveyn A, Steppe K, Lemeur R. 2006.** Report on non-temperature related variations in CO<sub>2</sub> efflux rates from young tree stems in the dormant season. *Trees - Structure and Function*.
- Saveyn A, Steppe K, Lemeur R. 2007.** Drought and the diurnal patterns of stem CO<sub>2</sub> efflux and xylem CO<sub>2</sub> concentration in young oak (*Quercus robur*). *Tree Physiology* **27**(3): 365-374.
- Saveyn A, Steppe K, McGuire MA, Lemeur R, Teskey RO. 2008.** Stem respiration and carbon dioxide efflux of young *Populus deltoides* trees in relation to temperature and xylem carbon dioxide concentration. *Oecologia* **154**(4): 637-649.
- Schaedle M. 1975.** Tree Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **26**(1): 101-115.
- Schaedle M, Brayman A. 1986.** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity of *Populus tremuloides* Michx. bark tissues. *Tree Physiology* **1**: 53-56.
- Scott DG. 1907.** On the distribution of chlorophyll in the young shoots of woody plants. *Annals of Botany* **19**: 153-155.
- Solhaug KA, Gauslaa Y, Haugen J. 1995.** Adverse effects of epiphytic crustose lichens upon stem photosynthesis and chlorophyll of *Populus tremula* L. *Botanica Acta* **108**: 233-239.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME. 2002.** RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better Enzyme. *Annual Review of Plant Biology* **53**(1): 449-475.
- Sprugel DG. 1989.** Components of woody-tissue respiration in *Abies amabilis*. *Annales Des Sciences Forestieres* **46**: 532-535.
- Sprugel DG. 1990.** Components of woody-tissue respiration in young *Abies amabilis* (Dougl.) Forbes trees. *Trees - Structure and Function* **4**: 88-98.
- Staswick PE. 1994.** Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**(1): 303-322.
- Stepien V, Sauter JJ, Martin F. 1994.** Vegetative storage proteins in woody-plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**(2): 185-192.
- Steppe K, Saveyn A, McGuire MA, Lemeur R, Teskey RO. 2007.** Resistance to radial CO<sub>2</sub> diffusion contributes to between-tree variation in CO<sub>2</sub> efflux of *Populus deltoides* stems. *Functional Plant Biology* **34**(9): 785-792.
- Stockfors J, Linder S. 1998.** Effect of nitrogen on the seasonal course of growth and maintenance respiration in stems of Norway spruce trees. *Tree Physiology* **18**: 155-166.
- Stringer JW, Kimmerer TW. 1993.** Refixation of xylem sap CO<sub>2</sub> in *Populus deltoides*. *Physiologia Plantarum* **89**: 243-251.

- Sun Q, Yoda K, Suzuki M, Suzuki H. 2003.** Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *Journal of Experimental Botany* **54**(387): 1627-1635.
- Szujko-Lacza J, Fekete G, Faludi-Daniel A. 1970.** Contributions to the conditions of photosynthetic activity of lignifying shoot axes. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae*. **16**(3-4): 393-404.
- Szujko-Lacza J, Rakovan JN, Norvath G, Fekete G, Faludi-Daniel A. 1971.** Anatomical, ultrastructural and physiological studies on one-year-old *Euonymus europaeus* bark displaying photosynthetic activity. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae* **20**: 247-260.
- Tcherkez G, Cornic G, Bligny R, Gout E, Ghashghaie J. 2005.** In vivo respiratory metabolism of illuminated leaves. *Plant Physiology* **138**(3): 1596-1606.
- Teskey RO, McGuire MA. 2002.** Carbon dioxide transport in xylem causes errors in estimation of rates of respiration in stems and branches of trees. *Plant, Cell and Environment* **25**(11): 1571-1577.
- Teskey RO, McGuire MA. 2007.** Measurement of stem respiration of sycamore (*Platanus occidentalis* L.) trees involves internal and external fluxes of CO<sub>2</sub> and possible transport of CO<sub>2</sub> from roots. *Plant, Cell & Environment* **30**(5): 570-579.
- Teskey RO, Saveyn A, Steppe K, McGuire MA. 2008.** Origin, fate and significance of CO<sub>2</sub> in tree stems. *New Phytologist* **177**(1): 17-32.
- Turgeon R, Medville R. 2004.** Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**(3): 3795-3803.
- Tyree MT, Salleo S, Nardini A, Assunta Lo Gullo M, Mosca R. 1999.** Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm? *Plant Physiology* **120**(1): 11-22.
- Utsumi Y, Sano Y, Funada R, Ohtani J, Fujikawa S. 2003.** Seasonal and perennial changes in the distribution of water in the sapwood of conifers in a sub-frigid zone. *Plant Physiology* **131**(4): 1826-1833.
- Van Bel AJE. 1993.** Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 253-281.
- Vogelmann TC. 1993.** Plant tissue optics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**(1): 231-251.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE. 2001.** Kranz anatomy is not essential for terrestrial C<sub>4</sub> plant photosynthesis. *Nature* **414**(6863): 543-546.
- Wiebe HH. 1975.** Photosynthesis in wood. *Physiologia Plantarum* **332**: 45-46.
- Wiebe HH, Al-Saadi HA, Kimball SL. 1974.** Photosynthesis in the anomalous secondary wood of *Atriplex confertifolia* stems. *American Journal of Botany* **61**: 444-448.
- Witt W, Sauter JJ. 1994.** Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilization and summer deposition. *Physiologia Plantarum* **92**(1): 9-16.

- Wittmann C, Aschan G, Pfanz H. 2001.** Leaf and twig photosynthesis of young beech (*Fagus sylvatica*) and aspen (*Populus tremula*) trees grown under different light regime. *Basic and Applied Biology* **2**: 145-154.
- Wittmann C, Pfanz H. 2007.** Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) trees. *Journal of Experimental Botany* **58**(15-16): 4293-4306.
- Wittmann C, Pfanz H, Loreto F, Centritto M, Pietrini F, Alessio G. 2006.** Stem CO<sub>2</sub> release under illumination: corticular photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell and Environment* **29**(6): 1149-1158.
- Wittmann C, Pfanz H, Pietrini F. 2005.** Light-modulation of corticular CO<sub>2</sub>-refixation in young birch stems (*Betula pendula* Roth.). *Phyton-Annales Rei Botanicae* **45**(3): 195-212.
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JH, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R. 2004.** The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**(6985): 821-827.
- Yoneyama T, Handley LL, Scrimgeour CM, Fisher DB, Raven JA. 1997.** Variations of the natural abundances of nitrogen and carbon isotopes in *Triticum aestivum*, with special reference to phloem and xylem exudates. *New Phytologist* **137**(2): 205-213.
- Zelawski W, Riech FP, Stanley RG. 1970.** Assimilation and release of internal carbon dioxide by woody plant shoots. *Canadian Journal of Botany* **48**: 1351-1354.

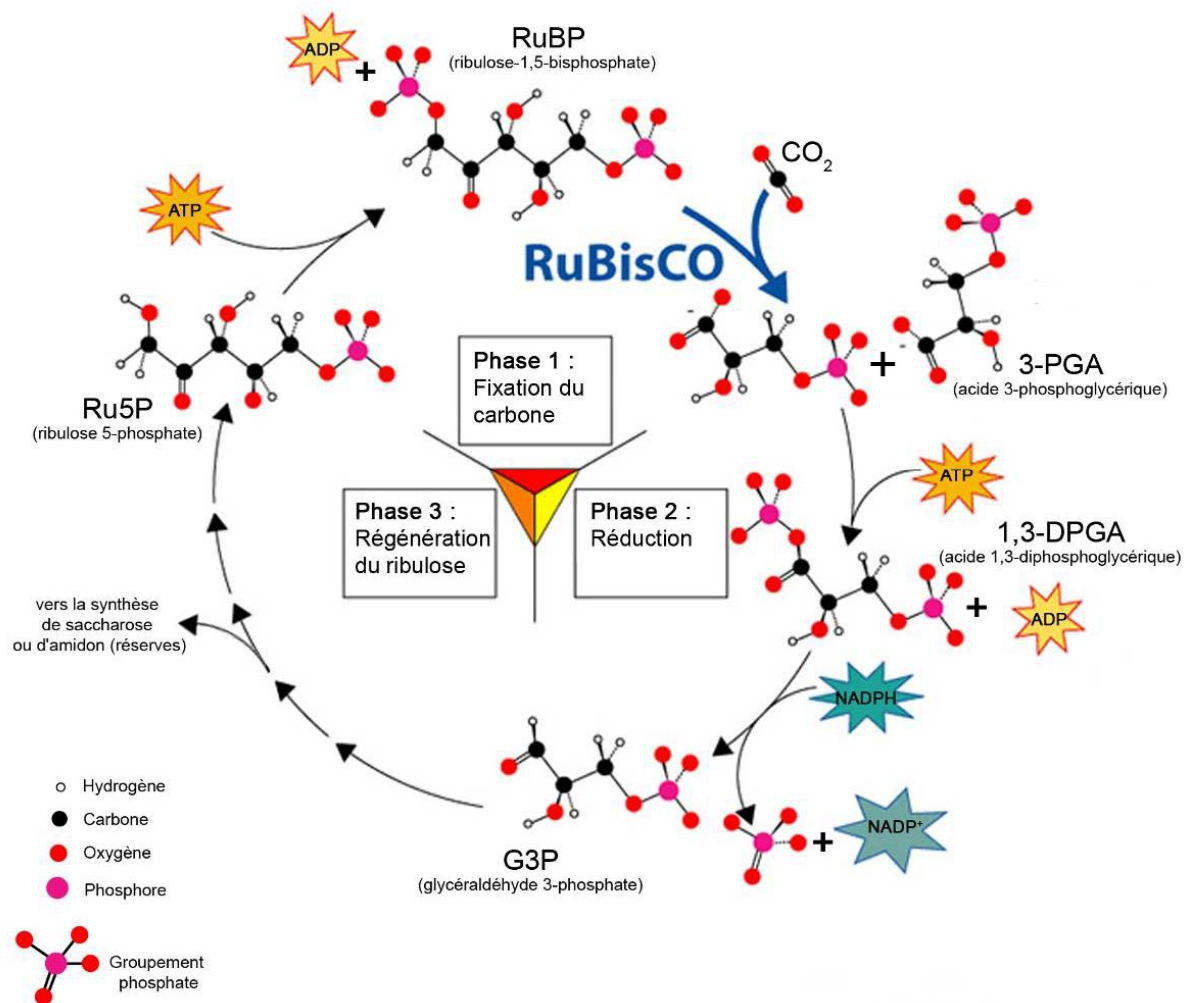


## ***VIII) ANNEXES***

---



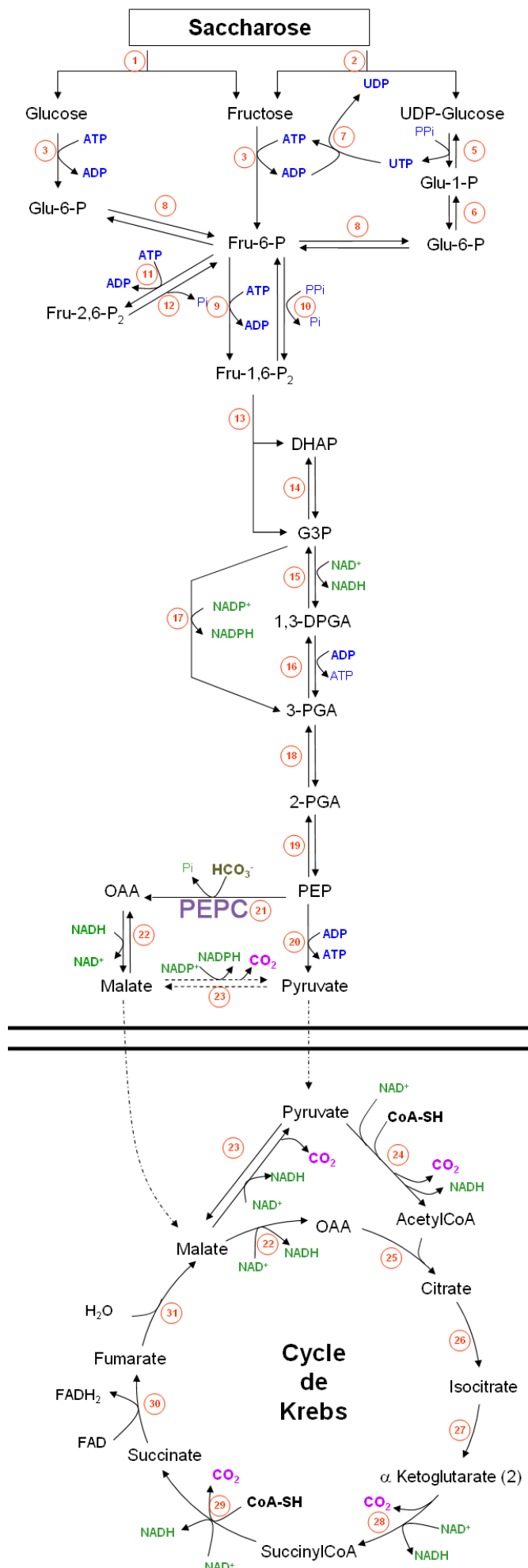
## Annexe 1 : Le cycle de Calvin-Benson-Bassham



L'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique (ATP et pouvoir réducteur sous la forme de NADPH) par la chaîne chloroplastique de transfert des électrons (chaîne de photophosphorylation). Cette énergie est ensuite utilisée dans le cycle de Calvin-Benson-Bassham dont l'étape catalysée par la fonction carboxylase de la Rubisco marque la première étape de la fixation du  $\text{CO}_2$ . D'après <http://en.wikipedia.org>.







## Annexe 2 : La glycolyse, le cycle de Krebs et la voie anaplérotique

Au niveau du cytosol, la **glycolyse** est le processus qui génère du pyruvate à partir des intermédiaires hexoses et trioses-phosphate (dérivés du saccharose ou de l'amidon). Ce pyruvate est ensuite transporté dans les mitochondries pour y être métabolisé en acétylCoA au niveau de la matrice mitochondriale par le complexe PDH (24 : pyruvate déshydrogénase). L'acétyl-coA intègre dès lors le cycle de Krebs. Ce processus produit également de l'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur, NADH.

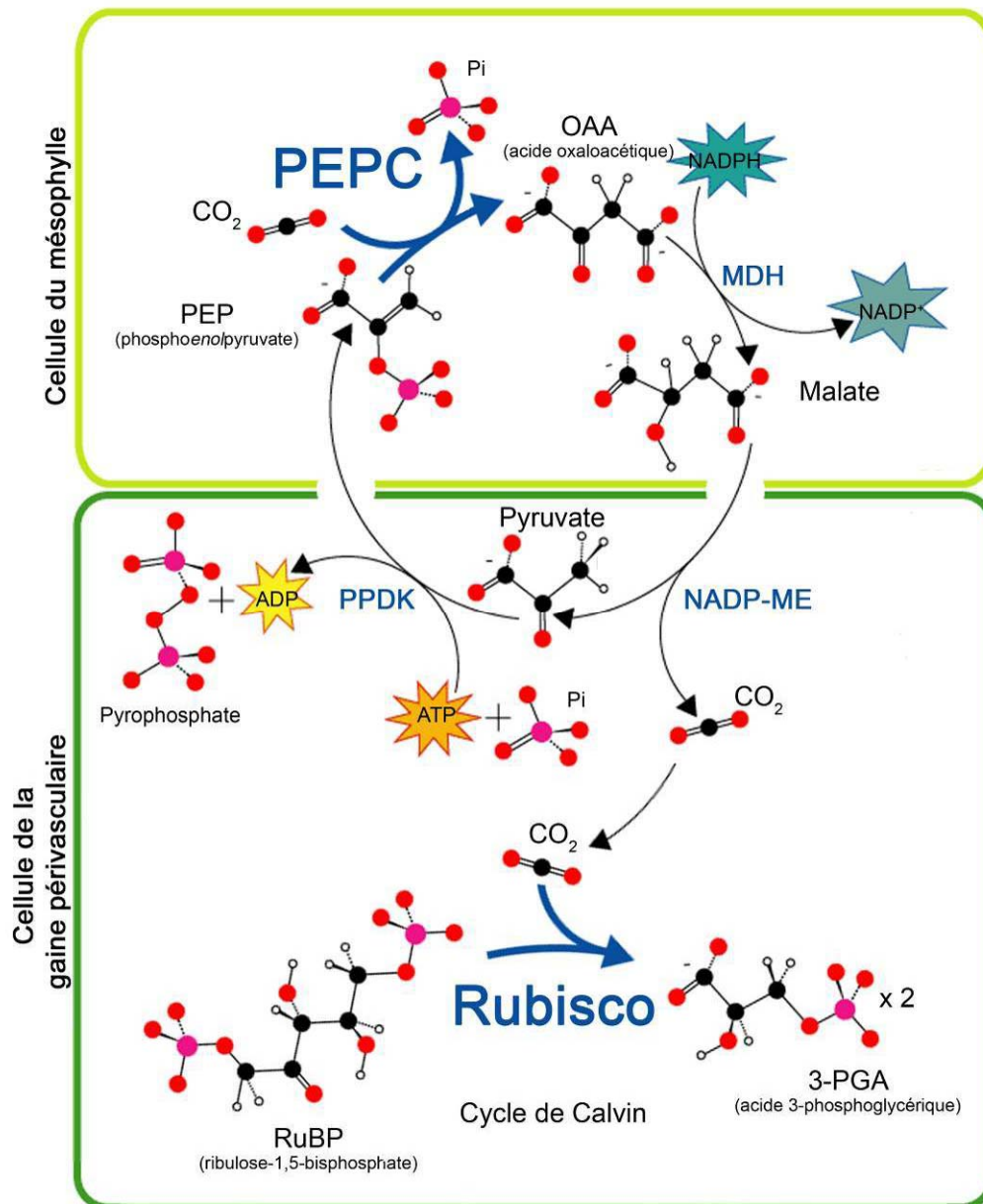
Dans le **cycle de Krebs**, l'acétyl-coA est oxydé complètement en CO<sub>2</sub> produisant l'équivalent de 16 NADH, 4 FADH<sub>2</sub> et 4 ATP par molécule de saccharose. Ils seront utilisés comme substrat par la chaîne respiratoire.

La **voie anaplérotique** est caractérisée par la PEPC (21 : phosphoenolpyruvate carboxylase). Cette voie a pour but de réapprovisionner le cycle de Krebs en intermédiaires carbonés comme l'acide oxaloacétique (OAA) et le malate. La voie anaplérotique est généralement stimulée lorsque la synthèse d'acides aminés, étroitement liée au cycle de Krebs, récupère des squelettes carbonés de ce dernier.

- 1 : invertase
- 2 : saccharose P-synthase
- 3 : glucokinase
- 4 : fructokinase
- 5 : UDPG phosphorylase
- 6 : glucomutase
- 7 : nucléoside di-P kinase
- 8 : P-glucose isomérase
- 9 : P-fructokinase 1
- 10 : pyrophosphate P-fructokinase
- 11 : P-fructokinase 2
- 12 : Fru-2,6-bisphosphatase
- 13 : aldolase
- 14 : triose-P isomérase
- 15 : NAD G3P déshydrogénase
- 16 : 3-PGA kinase
- 17 : NADP G3P déshydrogénase
- 18 : P-glycéromutase
- 19 : enolase
- 20 : pyruvate kinase
- 21 : PEP carboxylase
- 22 : malate déshydrogénase
- 23 : enzyme malique
- 24 : pyruvate déshydrogénase
- 25 : citrate synthase
- 26 : aconitase
- 27 : isocitrate déshydrogénase
- 28 : α ketoglutarate déshydrogénase
- 29 : succinylCoA synthétase
- 30 : succinate déshydrogénase
- 31 : fumarase



### Annexe 3 : Schéma simplifié du métabolisme C<sub>4</sub> indiquant la séparation spatiale des processus enzymatiques impliqués



Le CO<sub>2</sub> est fixé au niveau des cellules du mésophylle par la PEPC. Le malate issu de la dégradation de l'OAA par la malate déshydrogénase (MDH) est transporté ensuite dans les cellules de la gaine périvasculaire. Là, une enzyme décarboxylase, la NADP-ME (enzyme malique à NADP) se charge de libérer le CO<sub>2</sub> qui sera intégrer dans le cycle de Calvin par la Rubisco. Le PEP est régénéré par la PPDK (Pyruvate-Pi-Dikinase) afin de "boucler" le cycle.

La séparation spatiale des processus de carboxylation est indispensable au bon fonctionnement de ce type particulier de métabolisme carboné. En effet, le CO<sub>2</sub> libéré par la NADP-ME se concentre dans les cellules de la gaine périvasculaire avantageant ainsi la fonction carboxylase (devant de la fonction oxygénase) de la Rubisco.



## **Annexe 4 : Préparation d'échantillons de tiges de *Fagus sylvatica* L. en vue de la réalisation de coupes ultrafines observées sous MET**

### **Etude morphologique**

Jour 1	<p><u>Fixation</u> :</p> Tampon cacodylate 0.1 M ; pH=7.4 avec 3% glutaraldéhyde 1% paraformaldéhyde 1% acide Tannique 2% saccharose 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0.1% Brij 35	<p>Les échantillons ont été placés dans des tubes Eppendorf 2ml en présence de 1ml de fixateur. Certains d'entre eux ont dû être aidés (aiguille montée) afin qu'ils coulent au fond de l'Eppendorf. Dès que tous les tubes étaient prêts (une heure dans fixateur), ils furent placés à 3 reprises sous vide (pompe à eau). Enfin, ils ont été placés sous agitation roller pendant le reste de la journée et la nuit à 4°C.</p>																																		
Jour 2	<p><u>Post-Fixation</u>            Rinçage dans le tampon cacodylate 0.1 M            Post-fixation avec OsO<sub>4</sub> à 2% dans le tampon cacodylate 0.1 M            Rinçage dans le tampon cacodylate 0.1M            Rinçage à l'eau MQ</p> <p>Déshydratation - Substitution            Déshydratation à 4°C en agitation « roller » dans différents bains d'éthanol :            10% 15 min → 20% 15 min → 30% 20 min → 40% 20 min → 50% 30 min → 60% 30 min → 70% la nuit            Les échantillons trop gros ont été recoupés sous alcool et sous la loupe binoculaire dans le sens de la longueur entre les bains à 50 et 60% EtOH</p>	<p>4 fois 15 min à 4°C roller            1H30 à 4°C roller            15 minutes (changer de tube) roller            2 fois 15 minutes roller</p>																																		
Jour 3	<p>Certains échantillons (très petits) ont été mis en gélose avant le bain à 80% pour éviter de perdre le matériel au cours des changements de bains.            → 80% 30 min → 90% 30 min → 95% 30 min → 100% 3fois 30 min.</p> <p><u>Imprégnation</u>            Préparation de la résine d'imprégnation : résine Spurr composée de</p>	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>VCD</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>DER 736</td> <td>6 g</td> </tr> <tr> <td>NSA</td> <td>26 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Imprégnation à 4°C en agitation « roller » suivant différents bains :</p> <table border="0" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Ethanol 100%</th> <th style="text-align: center;">–</th> <th style="text-align: center;">Résine Spurr</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">4/5</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">1/5</td> <td>l'après midi</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3/5</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">2/5</td> <td>la nuit</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2/5</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">3/5</td> <td>la journée</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1/5</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">4/5</td> <td>la nuit</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">100%</td> <td>la journée (ss bouchon) à T°am</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">–</td> <td style="text-align: center;">100%</td> <td><u>2 jours</u></td> </tr> </tbody> </table>	VCD	10 g	DER 736	6 g	NSA	26 g	Ethanol 100%	–	Résine Spurr		4/5	–	1/5	l'après midi	3/5	–	2/5	la nuit	2/5	–	3/5	la journée	1/5	–	4/5	la nuit	0	–	100%	la journée (ss bouchon) à T°am	0	–	100%	<u>2 jours</u>
VCD	10 g																																			
DER 736	6 g																																			
NSA	26 g																																			
Ethanol 100%	–	Résine Spurr																																		
4/5	–	1/5	l'après midi																																	
3/5	–	2/5	la nuit																																	
2/5	–	3/5	la journée																																	
1/5	–	4/5	la nuit																																	
0	–	100%	la journée (ss bouchon) à T°am																																	
0	–	100%	<u>2 jours</u>																																	
Jour 4																																				
Jour 5																																				
Jour 8	<p><u>Inclusion</u>            Préparation de la résine d'inclusion : résine Spurr composée de</p> <p>Laisser 6 heures dans la résine Spurr + DMAE (cf. ci-dessus)            Inclusion dans des moules plats épais numérotés            Polymérisation à 70°C pendant 10 heures</p>	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>VCD</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>DER 736</td> <td>6 g</td> </tr> <tr> <td>NSA</td> <td>26 g</td> </tr> <tr> <td>DMAE</td> <td>0.4 g</td> </tr> </tbody> </table>	VCD	10 g	DER 736	6 g	NSA	26 g	DMAE	0.4 g																										
VCD	10 g																																			
DER 736	6 g																																			
NSA	26 g																																			
DMAE	0.4 g																																			

**Etude immunologique**

Jour 1	<p><u>Fixation</u> :</p> <p>Tampon cacodylate 0.1 M ; pH=7.3 avec            0.5% Glutaraldéhyde            4% Paraformaldéhyde            2 mM CaCl<sub>2</sub>            2% Saccharose            0.1% Brij 35</p>	<p>Placer chaque échantillon dans les tubes Eppendorf de 2 mL            Ajouter 1.5 ml de fixateur            Aidez les échantillons à couler à l'aide d'une aiguille montée</p> <p>Dès que tout est près (~1h dans fixateur), placer 3 x 10 min sous vide (pompe à eau). Placer sous agitation roller le reste de la journée et pendant une nuit à 4°C.</p>																																
Jour 2	<p><u>Rinçage</u>            Rinçages dans le tampon cacodylate 0.1 M            Rinçages dans Glycine 0.1 M            Rinçage dans le tampon cacodylate 0.1M</p> <p><u>Déshydratation - Substitution</u>            Déshydratation à 4°C en agitation « roller » dans différents bains d'éthanol :            10% 15 min → 20% 15 min → 30% 20 min → 50% 30 min → 70% 1 h → 90% 1 h            Les échantillons trop gros ont été recoupés sous alcool et sous la loupe binoculaire dans le sens de la longueur entre les bains à 50 et 60% EtOH</p> <p><u>Imprégnations</u></p>	<p>→ 4 fois 15 min à 4°C roller            → 4 fois 15 min à 4°C roller            → 4 fois 15 min à 4°C roller</p> <p><b>Ethanol 100% – Résine LR-White</b></p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>2/3</td> <td>–</td> <td>1/3</td> <td>la nuit</td> </tr> <tr> <td>1/2</td> <td>–</td> <td>1/2</td> <td>le matin</td> </tr> <tr> <td>1/3</td> <td>–</td> <td>2/3</td> <td>l'après-midi</td> </tr> <tr> <td>1/3</td> <td>–</td> <td>2/3</td> <td>la nuit</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>–</td> <td>100%</td> <td>la journée</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>–</td> <td>100%</td> <td>la nuit</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>–</td> <td>100%</td> <td>la journée</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>–</td> <td>100%</td> <td>le week-end</td> </tr> </tbody> </table>	2/3	–	1/3	la nuit	1/2	–	1/2	le matin	1/3	–	2/3	l'après-midi	1/3	–	2/3	la nuit	0	–	100%	la journée	0	–	100%	la nuit	0	–	100%	la journée	0	–	100%	le week-end
2/3	–	1/3	la nuit																															
1/2	–	1/2	le matin																															
1/3	–	2/3	l'après-midi																															
1/3	–	2/3	la nuit																															
0	–	100%	la journée																															
0	–	100%	la nuit																															
0	–	100%	la journée																															
0	–	100%	le week-end																															
Jour 3																																		
Jour 4																																		
Jour 5																																		
Jour 8	<p><u>Inclusion</u>            Préparation de la résine d'inclusion :            Pour 10 ml de résine LR-White, ajouter 1 goutte d'accélérateur.</p>																																	

## **Produits chimiques utilisés :**

### **Morphologie**

**Glutaraldéhyde** : solution mère (50%) conservée à 4°C  
3% (v/v) en final → 3 ml / 100 ml → 1.2 ml / 40 ml → **1.2 ml / 20 ml**

**Paraformaldéhyde** : solution mère (20%) conservée à 4°C  
1% (v/v) en final → 1 ml / 100 ml → 0.4 ml / 40ml → **1 ml / 20 ml**

**Acide tannique**: poudre  
1% (w/v) en final → 1 g / 100 ml → **0.2 g / 20 ml**

**Saccharose**: poudre  
2% (w/v) en final → 2 g / 100 ml → **0.4 g / 20 ml**

**Chlorure de calcium**: poudre  
2 mM en final → 2 mmol / 1 l → 0.08 mmol / 40 ml  
PM = 110 g / mol → 8.8 mg / 0.08 mmol → **4.4 mg / 20 ml**

**Brij 35**: poudre  
0.1% (w/v) → 0.1 g / 100 ml → **20 mg / 20 ml**

### **Immunologie**

**Glutaraldéhyde** : solution mère (50%) conservée à 4°C  
0.5% (v/v) en final → 0.5 ml / 100 ml → 1 ml / 100 ml → **0.2 ml / 20 ml**

**Paraformaldéhyde** : solution mère (20%) conservée à 4°C  
4% (v/v) en final → 4 ml / 100 ml → 20 ml / 100 ml → **4 ml / 20 ml**

**Saccharose** : poudre  
2% (w/v) en final → 2 g / 100 ml → **400 mg / 20 ml**

**Chlorure de calcium** : poudre  
2 mM en final → 2 mmol / 1 l → 0.04 mmol / 20 ml  
PM = 110 g / mol → 4.4 mg / 0.04 mmol → **4.4 mg / 20 ml**

**Brij 35** : poudre  
0.1% (w/v) → 0.1 g / 100 ml → **20 mg / 20 ml**

**Glycine** : poudre  
0.1 M en final → 0.1 mol / 1 l → 2 mmol / 20 ml  
PM = 75.07 g / mol → **150 mg / 20 ml**





## **Annexe 5** : Protocole de Western Blot pour la détection de la PEPC des tiges de *Fagus sylvatica* L.

### **Electrophorèse sur gel d'acrylamide**

Le gel d'électrophorèse constitué de :

	<b>Separating Gel, 10 ml (8% d'Acrylamide)</b>	<b>Stacking Gel, 5 ml (4% d'Acrylamide)</b>
Acrylamide à 40 %	2.00 ml	0.5 ml
Tampon Tris 1.5 M, pH 8.8	2.50 ml	
Tampon Tris 0.5 M, pH 6.8		1.25 ml
H <sub>2</sub> O	5.34 ml	3.14 ml
SDS à 10 %	0.1 ml	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
APS	50 µl	50 µl

Le tampon d'électrophorèse est constitué de Tampon Tris-glycine 1x (dilution depuis la solution 10x) + 0.1 % SDS avec Tricglycine 10x (30.3 g/l de Tris base + 144 g/l de glycine)

Lancement de l'électrophorèse à 100V, température ambiante, pendant 2 heures

### **Western**

Tampon de transfert constitué de : Trisglycine 10x (100 ml), Ethanol absolu (200 ml), SDS 20% (5 ml) et H<sub>2</sub>O (695 ml)

Transfert à 350 mA constant et à une température de +4°C pendant 1h30-2h00 ou à 30 V pendant toute une nuit et à une température de +4°C.

### **Révélation**

La révélation nécessite la réalisation de tampon de lavage et de blocage :

<b>Solution de lavage :</b>		<b>Solution de blocage :</b>	
PBS 10x	100 ml	Caséine	1 g (dans 250 ml d'H <sub>2</sub> O)
H <sub>2</sub> O	900 ml	PBS 10x	30 ml
Tween 20	3 ml	H <sub>2</sub> O	20 ml
		Tween 20	300 µl

- Laver la membrane de nitrocellulose pendant 5 min à agitation constante dans 20 ml de solution de lavage
- Bloquer la membrane avec 20 ml de solution de blocage en agitation pendant une heure minimum
- Bloquer la membrane avec 25 ml de solution de blocage contenant les **anticorps primaires** (voir article selon la protéine révélée) en agitation pendant une heure minimum
- Laver deux fois 5 min en agitation avec 20 ml de solution de lavage
- Bloquer deux fois 5 min en agitation avec 20 ml de solution de blocage
- Bloquer la membrane avec 25 ml de solution de blocage contenant les anticorps secondaires en agitation pendant une heure minimum
- Laver 1 fois 5 min en agitation avec 20 ml de solution de blocage
- Laver 5 fois 5 min en agitation avec 20 ml de solution de lavage

Révéler en contact et en agitation douce avec la solution ECL (1 vol de luminol + 1 vol d'enhancer).  
Sceller la membrane avant d'imprimer le film photographique en chambre noire.





## Résumé

L'assimilation de carbone des plantes est principalement assurée par la photosynthèse foliaire. Cependant, d'autres organes sont capables de photosynthétiser et de refixer une partie du carbone perdu par respiration. C'est le cas des tiges de la plupart des espèces herbacées mais également des espèces ligneuses. L'objectif principal de cette thèse a été d'examiner chez les arbres, les processus écophysiological et biochimiques, encore très peu étudiés, de la photosynthèse des jeunes tiges. L'étude s'est focalisée sur le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) mais aussi sur d'autres espèces tempérées. Des mesures d'échanges gazeux, de fluorescence chlorophyllienne, d'activités enzymatiques ainsi que des contenus en chlorophylle et azote ont été réalisées. Les résultats montrent une variabilité interspécifique et saisonnière de l'assimilation de carbone. La photosynthèse brute mesurée à éclaircissement saturant ( $P_g$ ) est positivement corrélée aux contenus en chlorophylle et en azote des tiges, aussi bien en interspécifique qu'en intraspécifique. Chez le hêtre,  $P_g$  est maximale en début de saison ( $3.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) puis diminue progressivement avec la formation des tissus périphériques qui composent l'écorce, pour atteindre des valeurs hivernales de  $0.5\text{-}1.0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . L'activité totale Rubisco est très faible, comparée aux feuilles, alors que l'activité PEPC montre une activité jusqu'à 13 fois supérieure chez la tige. Ajoutée à la configuration concentrique des tissus et aux observations de distribution de la chlorophylle dans la tige réalisées sous microscopie à épifluorescence, la forte activité PEPC mesurée chez la jeune tige de hêtre a soulevé l'hypothèse d'un métabolisme de type  $C_4$  dans la tige. Nous montrons qu'il n'y a pas de distribution radiale préférentielle ni de la Rubisco, ni de la PEPC dans les tiges et que les caractéristiques biochimiques de la PEPC sont typiques de plantes en  $C_3$ . L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure qu'en terme de fonctionnement, la photosynthèse des tiges est similaire à celles des feuilles et que la PEPC semble jouer un rôle relativement important dans la refixation de carbone dans la tige. Ce travail ouvre plusieurs perspectives notamment sur le devenir des assimilats des tiges et l'importance de la photosynthèse des tiges dans le bilan de carbone à l'échelle de l'arbre.

Mots clés : photosynthèse des tiges, métabolisme carboné, Rubisco, PEPC, *Fagus sylvatica*.

## Abstract

Plant carbon assimilation is mainly provided by leaf photosynthesis. However, other plant organs are able to photosynthesize and to refix a part of C lost by respiration. That is the case of plant stems of most herbaceous species but also of woody species. The main goal of this thesis was to investigate the little-studied ecophysiological and biochemical processes of photosynthesis in the young stems of trees. The study particularly focused on the European beech (*Fagus sylvatica* L.) and some other temperate tree species. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, enzyme activities, chlorophyll and nitrogen content measurements were achieved. Results show an interspecific and a seasonal variability of stem carbon assimilation. Light-saturated gross photosynthesis ( $P_g$ ) is positively correlated to the chlorophyll and nitrogen contents. For the beech,  $P_g$  is maximal at the beginning of the season ( $3.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and decreased with bark tissues growth to reach  $0.5\text{-}1.0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in winter. In comparison with leaves, the Rubisco total activity measured in young stems is very low while PEPC activity is up to 13 times higher. Coupled with the concentrically organized tissues of tree stem and the observations of chlorophyll distribution shown by epifluorescence microscopy, the high stem PEPC activity suggested the possibility of a  $C_4$ -type metabolism in young stems of beech. Immunogold labelling does not reveal any differential localization of PEPC and Rubisco and leaf and stem PEPCs exhibit classical biochemical characteristics of  $C_3$  PEPCs. All these results allow us to conclude that the stem photosynthesis functioning is similar to the one of the tree leaves and that PEPC seems to play a relatively important role in stem carbon refixation. This work opens several prospects on stem carbon assimilation, especially on the stem photoassimilates allocation and the importance of stem photosynthesis in tree carbon balance.

Key words: stem photosynthesis, carbon metabolism, Rubisco, PEPC, *Fagus sylvatica*.