



UFR Sciences et Techniques

Ecole Doctorale : Homme Environnement Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Franche-Comté, Besançon

Spécialité : Sciences de la vie

par Sandrine Barthod

**Variabilité interspécifique et plasticité du coût associé
au déploiement de la surface assimilatrice
chez des semis forestiers en régénération naturelle**

Soutenue le 25 octobre 2006

Membres du jury:

Directeur de Thèse :

Daniel Epron, Professeur

Université Henri Poincaré, Nancy I

Rapporteurs :

Erwin Dreyer, Directeur de Recherche

INRA, Nancy

Franck Brignolas, Maître de Conférences, HDR

Université d'Orléans, Orléans

Examineurs :

Sylvie Meyer, Maître de Conférences

Université de Paris VII

Pierre Marie. Badot, Professeur

Université de Franche-Comté, Besançon



Avant-propos

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Environnementale de Franche-Comté, sur le site de Montbéliard dans le cadre d'une allocation de recherche du ministère de la recherche. Il a bénéficié d'un financement du GDR FluoVeg « Groupe De Recherches sur l'utilisation de la Fluorescence pour l'estimation de la productivité Végétale » et d'un financement du Réseau de l'Ecophysologie de l'Arbre (REA-INRA).

Je tiens à remercier Messieurs Patrick Giraudoux et Pierre-Marie Badot pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Daniel Epron pour avoir assumé la direction de mon DEA et de ma thèse. Je le remercie pour la formation qu'il m'a offerte, son encadrement, ses nombreux conseils. Pour sa confiance et son soutien, je le remercie vivement.

Je remercie Messieurs Erwin Dreyer, Franck Brignolas, Pierre-Marie Badot et Madame Sylvie Meyer qui m'ont fait l'honneur de participer au jury.

Que Messieurs Erwin Dreyer et Franck Brignolas soient assurés de ma gratitude pour avoir accepté de porter un jugement sur mon travail.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes de l'administration, Ghislain Peter, Mariette Jobard, Isabelle Gester, Brigitte Jolibois, Françoise Gualdi et aux personnes du service informatique Hervé Richard, Claude Girard, Michael Renard pour avoir grandement facilité mon travail, pour leur disponibilité et leur efficacité.

Merci au personnel de l'INRA de Nancy, qui a su m'accueillir au moment des dosages et de la rédaction. Merci en particulier à Jacqueline Marchand, Claude Brechet et Christian Hossann pour leur aide dans les analyses élémentaires et Pierre Montpied et Vincent Badeau pour leurs conseils en statistiques. Merci également à Alexandre Piboule et Catherine Collet, pour m'avoir proposé de travailler avec eux sur la forêt du « Graouilly »

Sans oublier les collègues de l'UMR Ecofog de Guyane, Damien Bonal, Jean-Christophe Roggy et Sabrina Coste pour m'avoir aidé à mettre en place mes manip à Paracou.

Merci à Zoran Cerovic, pour m'avoir prêté le Dualex, et pour avoir accepté de faire équipe avec nous.

Merci aussi aux étudiants de Montbéliard, outre le mérite de m'avoir supporté, ont été sympathiques, patients et m'ont permis de tester et d'affiner ma pédagogie, voire de me faire (re)plonger dans les bases de la biochimie, tout cela me servant encore quotidiennement.

Remerciements

Un grand merci à Marielle Franchi et Marie-Laure Toussaint pour leur soutien technique, à Geneviève Chiapusio pour ses conseils et merci à Bastien, Philippe et Nadine.

Merci à mes amis de l'équipe pédagogique, Marielle Franchi, Jean-Luc Sanner, Jean-Pierre Verovic, Ghislain Peter, pour leurs bonne humeur, qui ces dernières années, ont beaucoup compté pour moi.

Merci aussi à mes collègues et amis « de l'étage d'en bas » Edwige, Carine, Jean-Marie, David, et ceux du laboratoire de Besançon Hung, Anne-Laure, Anne, Frédéric. Je leur exprime ma profonde sympathie.

Je souhaite enfin remercier très chaleureusement ma famille: mes Parents, Muriel et Laure pour leur soutien et leurs encouragements.

Un immense merci à Denis pour son coaching, sa patience et son aide très précieuse.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Table des illustrations

<i>Introduction.....</i>	<i>1</i>
1. La régénération naturelle en forêt hétéroène	5
1.1. La forêt hétérogène.....	5
1.2. La régénération naturelle	5
1.3. Le choix du dispositif expérimental	6
1.4. Autécologie des espèces	7
1.5. Estimation du climat lumineux	8
Les photographies hémisphériques	8
2. La tolérance à l'ombrage.....	11
2.1. Définition de la tolérance à l'ombrage.....	11
2.2. La tolérance à l'ombrage à l'échelle de la feuille.....	12
2.3. La tolérance à l'ombrage à l'échelle de la plante entière.....	14
3. Le Coût de construction.....	17
3.1. Définition du coût de construction	17
3.2. Méthodes d'estimation du coût de construction	19
• Estimation du coût par analyse de la composition chimique	19
• Estimation du coût par analyse de la composition élémentaire	21
• Estimation du coût par la chaleur de combustion	23
• Estimation du coût par la teneur en carbone.....	26
• Comparaisons des différentes méthodes d'estimation du coût de construction.....	27
3.3. Les déterminants biochimiques du coût de construction.....	29
• Les cendres et les minéraux.....	29
• L'azote et les protéines	29
• Les composés phénoliques	31
• Le résidu pariétal et ses constituants	33
• Les autres constituants.....	33
3.4. Variabilité de la composition biochimique et du CC des tissus végétaux.....	33
• Les facteurs biologiques	33
• Les facteurs environnementaux	36

4. Variabilité interspécifique et plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice.....	39
4.1. La notion de coût associé au déploiement de la surface assimilatrice.....	39
4.2. Les différences interspécifiques de mise en place de la surface assimilatrice	40
• Les différences interspécifiques de coût de construction des feuilles.....	41
• Les différences interspécifiques de composition biochimique des feuilles	43
• Les différences interspécifiques de coût de construction des autres organes	48
• La surface spécifique des feuilles	48
• Les différences interspécifiques de coût au niveau de la tige feuillée	49
4.3. La plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice.....	50
• Définition de la plasticité.....	50
• La plasticité du coût de construction des feuilles	50
• La composition biochimique des feuilles	52
• La surface spécifique des feuilles et l'allocation de biomasse.....	54
• Coût de la tige feuillée par unité de surface (CC _A).....	56
5. Conclusions et Perspectives	59
Références bibliographiques.....	63

Annexes

- **Annexe A** : Article accepté, Annals of Forest Sciences
- **Annexe B** : Article *in press*, Journal of Experimental Botany
- **Annexe C** : Article soumis à Oecologia
- **Annexe D** : Mesures microcalorimétriques de la chaleur de combustion de la matière sèche et du résidu pariétal
- **Annexe E** : Comparaison de méthodes pour estimer le contenu en LIG et en TSC dans le résidu pariétal
- **Annexe F** : Protocole pour déterminer la composition biochimique du matériel végétal

Références bibliographiques des annexes

Table des illustrations des annexes

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 2-1 : Courbes de saturation de la photosynthèse	11
Figure 3-1 : Représentation du devenir du glucose produit par la photosynthèse.....	17
Figure 3-2 : Représentation du gain carboné total	18
Figure 4-1 : Coût de construction pour 12 espèces ligneuses feuillues	41
Figure 4-2 : Caractérisation de la composition biochimique des feuilles	44
Figure 4-3 : Analyse en composantes principales des variables de la composition biochimique et du coût de construction des feuilles	46
Figure 4-4 : Analyse en composante principale de la répartition des plants par espèces et par tempéremment.....	47
Figure 4-5 : Relation entre le climat lumineux et le coût de construction des feuilles.....	51
Figure 4-6 : Relation entre le climat lumineux et la surface spécifique des feuilles.....	54
Figure 4-7 : Relation entre le climat lumineux et le coût de mise en place de la surface assimilatrice	56

Tableaux

Tableau 1-1 : Autécologie des espèces étudiées.....	7
Tableau 3-1 : Taux de glucose nécessaire pour fabriquer un gramme des différentes classes de composés biochimiques.	19
Tableau 3-2 : Equivalent en glucose (GE) et coût de construction (CC) et efficacité de biosynthèse (Eg).....	22
Tableau 3-3 : Liste des variables étudiées, chez les espèces tempérées au niveau des feuilles. .	38

Equations

Équation 3-1 : Détermination du coût de construction d'après la méthode biochimique.	20
Équation 3-2 : Calcul de l'état de réduction de la matière végétale.....	21
Équation 3-3 : Calcul des équivalents en glucose du squelette carboné	22
Équation 3-4 : Calcul du coût de construction d'après la composition élémentaire	23
Équation 3-5 : Calcul du coût de construction d'après la chaleur de combustion	25
Équation 3-6 : Calcul du coût de construction d'après la teneur en carbone.....	27

INTRODUCTION

La conception de la forêt française a fortement évolué ces dernières décennies pour la société qui lui reconnaît un nombre croissant de rôles. Elle est désormais dite multifonctionnelle et représente un enjeu croissant au niveau écologique et social tout en présentant des intérêts en termes de production. Sur le plan économique (fonction qui lui est déjà très ancienne) la forêt doit assurer la production de bois d'œuvre, de bois de trituration et de bois de chauffage, afin de répondre aux besoins de la société. Sur le plan écologique, la forêt joue un rôle dans la régulation du climat (séquestration du carbone), dans la lutte contre l'érosion et les inondations et dans la conservation de la biodiversité végétale et animale. Sur le plan social, du fait de la prise en compte de sa valeur patrimoniale et de sa fonction paysagère, la forêt est devenue un lieu d'accueil des activités (loisirs, culture...).

Au niveau européen et national, on observe un fort regain d'intérêt pour les peuplements hétérogènes et plus particulièrement pour les peuplements inéquiens et plurispécifiques (Duchiron 1994; Otto 1997). Les peuplements mélangés offrent en effet une meilleure résilience vis-à-vis des perturbations et des aléas naturels (vents, sécheresses, pathogènes, ravageurs...) ou anthropiques (pollution) tout en assurant la ressource forestière. Par ailleurs, sur les marchés du bois, on s'attend à une augmentation de la plus-value financière associée aux bois issus de ces forêts écocertifiées. En matière d'orientation sylvicole, tous les documents actuels d'aide à la gestion recommandent le mélange. Ils préconisent de maintenir le mélange là où il existe en respectant les essences minoritaires et, lorsque les peuplements sont purs, de le créer en favorisant son apparition naturelle ou en l'introduisant par plantation. Néanmoins, les questions sur les modalités d'obtention et de maintien du mélange restent très ouvertes en raison du manque de connaissances sur le comportement des essences constituant ces mélanges. Il est cependant reconnu que dans ces peuplements hétérogènes, le dosage du couvert (pendant la phase de régénération) constitue le principal outil pour contrôler le devenir de la régénération et pour assurer le succès de l'installation des peuplements (composition spécifique, structuration verticale). Les connaissances actuellement disponibles sur la dynamique de croissance des essences associées proviennent principalement d'études faites dans des peuplements réguliers monospécifiques, ces connaissances sont difficilement extrapolables aux peuplements mélangés (Spellmann 1992). En effet, les différentes essences qui peuvent former un mélange réagissent de manière spécifique à l'ombrage dispensé par le

couvert adulte, aussi bien en termes de survie, qu'en termes de vitesse de croissance et de morphologie.

En préalable à l'élaboration des interventions à pratiquer pour assurer une bonne gestion de ces mélanges, le gestionnaire a besoin de connaissances scientifiques sur les performances écophysiologicals et sur la plasticité phénotypique de ces espèces face au principal facteur écologique contrôlant la régénération qui est la disponibilité en lumière. Or de telles données font actuellement défaut. Ces différences interspécifiques de tolérance à l'ombrage ont souvent été décrites empiriquement, mais n'ont pas fait l'objet d'une analyse détaillée permettant d'attribuer l'avantage compétitif pour la lumière de ces espèces, soit à une meilleure efficacité d'acquisition des ressources, soit à une meilleure efficacité d'utilisation de ces ressources. Une hypothèse probable sur la tolérance à l'ombrage est que le bilan de carbone devient négatif du fait des faibles niveaux d'assimilation de CO₂ qui ne compensent pas les pertes respiratoires et qui ne permettent pas la constitution de réserves suffisantes. Cette hypothèse n'a cependant jamais été testée. En arrière plan se profile une question déjà très ancienne mais qui demande des réponses plus précises basées sur des approches moins empiriques : quels sont les traits fonctionnels qui caractérisent le degré de tolérance à l'ombrage de semis forestiers ?

L'objectif général de ce travail de recherche était d'étudier la variabilité interspécifique et la plasticité (variabilité intraspécifique) du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice. Si cette variabilité existait, il s'agissait de comprendre quelle était la part due à des différences morphologiques et celle due à des différences biochimiques. Ensuite, il s'agissait de voir si les coûts de construction étaient susceptibles d'expliquer les différences interspécifiques de tolérance à l'ombrage.

Il s'agissait plus particulièrement :

- de caractériser la diversité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice chez des semis de quelques essences feuillues caractéristiques des forêts sur plateaux calcaires lorrains, et dans une moindre mesure, de trois espèces de la forêt tropicale humide guyanaise,

- d'analyser la plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice chez les semis de ces espèces dans un gradient de lumière,

- de relier cette diversité et cette plasticité à la composition biochimique des feuilles, notamment celles de composés coûteux tels que les phénols (composés connus pour leur forte variabilité face au climat lumineux). Pour cela, une méthode optique non invasive (le Dualex) a été testée comme outil permettant une estimation rapide de la teneur en composés phénoliques dans l'épiderme.

Cette thèse se présente sous forme d'une synthèse à laquelle est associée un article publié et deux articles soumis pour publication. Quelques annexes complètent le document.

Dans la première partie, après avoir défini les notions de régénération naturelle et de forêt hétérogène, j'ai expliqué le choix du dispositif expérimental, le choix des espèces étudiées et j'ai discuté de l'utilisation des photos hémisphériques pour caractériser le climat lumineux. Un bref historique sur la perception de la tolérance à l'ombrage, sous un angle écologique et écophysiologie a été présenté en deuxième partie. J'ai justifié comment le coût de construction associé au déploiement de la surface assimilatrice s'intègre dans la tolérance à l'ombrage. Dans la troisième partie, j'ai expliqué ce qu'est le coût de construction, comment il est mesuré, en faisant également une synthèse bibliographique sur les facteurs de variation du coût de construction. L'ensemble des résultats (publiés ou soumis à publication) concernant la variabilité interspécifique du coût de construction de la surface assimilatrice et de sa plasticité en réponse à l'ombrage obtenus au cours de mon travail de thèse ont été analysés et discutés dans la quatrième partie

1. LA RÉGÉNÉRATION NATURELLE EN FORÊT HÉTÉROGÈNE

1.1. La forêt hétérogène

A l'opposé des peuplements réguliers qui sont des peuplements forestiers composés d'arbres d'une même espèce et de même âge, issus la plupart du temps de plantations, on distingue les peuplements forestiers « complexes ». Ils peuvent être irréguliers ou mélangés (Duchiron 1994 ; Otto 1997). Les peuplements irréguliers sont composés d'arbres d'âges et de tailles différentes, les peuplements mélangés sont composés d'espèces différentes. Dans ces deux types de peuplement, la régénération s'exprime rarement de façon uniforme, il en résulte une mosaïque de tâches de régénération en fonction de la lumière.

1.2. La régénération naturelle

La régénération naturelle est une technique qui fait appel à l'ensemencement spontané : elle s'oppose aux techniques d'enrichissement ou de plantation. Il s'agit de l'ensemble des processus dynamiques qui permettent de reconstituer un couvert qui a été entamé (Foggie 1960 ; Alexandre), c'est aussi la population de brins en sous-bois (Rollet 1969).

La forêt n'a pas besoin de l'homme pour se régénérer. Le cycle normal de croissance, fructification, dégénérescence, permet aux jeunes semis de prendre la place des arbres morts naturellement, que se soit de vieillesse ou par événement climatique ou parasitaire. Dans une forêt de production, dont l'objectif est de récolter des arbres avant leur dépérissement, ayant un âge de récolte généralement inférieur à la moitié de la durée de vie naturelle de l'arbre, le maintien de semenciers de qualité est une priorité pour bénéficier de régénération naturelle.

Les avantages de la régénération naturelle sont nombreux. Par exemple, elle préserve le patrimoine génétique local, elle occasionne des travaux qui perturbent peu le sol. Elle peut être plus ou moins facile à obtenir en fonction de l'existence de semenciers, de l'environnement forestier et de la qualité du sol. Par le seul maintien de petites ouvertures dans le peuplement, elle permet de diminuer le coût de gestion. Cependant, obtenir une bonne régénération naturelle demande une certaine connaissance du milieu et des exigences écologiques des espèces qui le constituent.

En France, cette évolution progressive de la gestion forestière vers la régénération naturelle s'est accélérée depuis la tempête de 1999, en particulier dans les régions très touchées comme

la Lorraine. La charte partenariale pour la restauration après tempête demande de donner la priorité à la régénération naturelle des essences et de provenance locales adaptées aux stations, et d'éviter les reboisements artificiels sauf si ils sont indispensables (stations difficiles, absence de semenciers des essences recherchées, inadaptation des géotypes présents...), (recommandations n° 31 et 33, site 1). C'est l'étude de l'influence de la lumière, sur les jeunes arbres des sous-bois, qui présente le plus d'intérêt pour le forestier. En effet, toute son action doit être dirigée vers le développement des jeunes régénérations naturelles qui constituent l'avenir de la forêt.

1.3. Le choix du dispositif expérimental

La forêt expérimentale devait comporter un peuplement irrégulier et mélangé en essences feuillues, caractéristiques des forêts françaises de plaine. Le site devait contenir en particulier un mélange d'essences dans la régénération, au stade de juvéniles établis où la phase de croissance en compétition avait commencé mais n'était pas terminée. Pour répondre à la question de tolérance à l'ombrage, ce peuplement devait contenir une variabilité importante d'éclaircissement : des trouées de tailles diverses et des zones de très faible éclaircissement. Enfin, afin de minimiser toute interférence avec d'autres facteurs écologiques autre que celui de la lumière, nous souhaitions une station relativement homogène au niveau du sol, où la pression du gibier n'était pas trop importante.

L'étude a donc été réalisée dans une forêt naturelle en cours de régénération. La forêt domaniale du Graoully se situe en Moselle (57), sur la commune d'Ars-sur-Moselle, près de Metz [49°05' N en longitude; 6°02' E en latitude ; 300 m d'altitude]. La strate arborée est dominée par le hêtre et l'érable sycomore. En sous étage on trouve en plus l'érable champêtre, l'érable plane, le frêne, le charme, le tilleul, l'alisier blanc, l'alisier torminal et l'orme. Le peuplement est un ancien taillis sous futaie sur plateau calcaire et n'a subi que quelques rares prélèvements depuis 1989. La présence de chablis offre des conditions de lumière très contrastées pour les jeunes semis. Le climat est tempéré, la température moyenne annuelle est de 10,1°C (avec un minimum de 1,6°C en janvier et un maximum de 18,7°C en juillet), la hauteur moyenne annuelle des précipitations est de 745 mm (données météorologiques de la station de Metz-Augny, sur la période de 1946-2001). Le sol est calcaire et relativement homogène. Afin de compléter l'étude sur la diversité du coût de construction, nous avons choisi d'étudier d'autres espèces appartenant à l'écosystème tropical, où les espèces se révèlent davantage tolérantes à l'ombrage. Pour cela, un site a été

choisi en forêt tropicale humide, sur le dispositif expérimental de Paracou en Guyane Française [5°15' N en longitude, 53° W en latitude et une altitude comprise entre 10 et 50 m]. Ce dispositif est localisé à 50 km au Nord-Ouest de Kourou.

1.4. Autécologie des espèces

Les 9 espèces sélectionnées dans cette étude sont toutes très communes dans les forêts tempérées. Ces espèces présentent des dynamiques de croissance initiale fortement contrastées. En forêt tropicale trois espèces aux tempéraments différents ont été choisies.

Tableau 1-1 : Autécologie des espèces étudiées sur le site du Graouilly en été 2003 et 2004 (Rameau *et al.* 1993) et des espèces étudiées sur le site de Paracou en été 2003 (Ecofog.cirad, site 2)

Nom Français	Nom Latin	Famille	Stade de succession	Tempérament
Hêtre commun	<i>Fagus sylvatica L.</i>	Fagacées	dryade	sciaphile
Erable sycomore	<i>Acer pseudoplatanus L.</i>	Aceraceae	postpionnière, nomade	demi ombre - ombre
Erable plane	<i>Acer platanoides L.</i>	Aceraceae	postpionnière, nomade	demi ombre
Erable champêtre	<i>Acer campestre L.</i>	Aceraceae	postpionnière, nomade	héliophile - demi ombre
Frêne commun	<i>Fraxinus excelsior L.</i>	Oléacées	postpionnière, nomade	héliophile - demi ombre
Tilleul à petites feuilles	<i>Tilia cordata Mill.</i>	Tiliacées	postpionnière, nomade	demi ombre
Alisier torminal	<i>Sorbus torminalis L.</i>	Rosaceae	postpionnière, nomade	thermophile
Alisier blanc	<i>Sorbus aria L.</i>	Rosaceae	postpionnière, nomade	héliophile
Orme de montagne	<i>Ulmus glabra Huds.</i>	Ulmaceae	postpionnière, nomade	demi ombre
Gaulette Blanche	<i>Licania alba</i>	Chrysobalanaceae	dryade	sciaphile
Manil marécage	<i>Symphonia globulifera L.F</i>	Clusiaceae	postpionnière	demi-ombre
Diaguidia	<i>Tachigali melinonii</i>	Caesalpiniaceae	postpionnière	héliophile

1.5. Estimation du climat lumineux

En sous bois, les trouées et tâches de lumière sont fondamentales pour la survie et la croissance des jeunes semis dont les exigences diffèrent selon les différents stades juvéniles. Il est donc important de savoir quel climat lumineux règne dans telle ou telle station forestière. Dans une station de plein découvert comme en sous-bois, la lumière varie perpétuellement, et ce de façon considérable, suivant l'heure, l'époque de l'année et l'état du ciel. Toute mesure instantanée du climat lumineux, n'est donc pas suffisante pour caractériser le climat lumineux. À l'opposé des observations cumulées sur de longues durées ont une valeur certaine. Mais il est souvent difficile d'installer et de surveiller, pendant plusieurs mois, des appareils délicats, et souvent coûteux, particulièrement dans les lieux isolés. On préfère donc utiliser la notion d'"éclairage relatif", rapport entre la lumière régnant dans tel ou tel sous-bois et celle du plein découvert au même moment. Cet éclairage relatif, qui représente le facteur de transmission optique des cimes, présente un intérêt certain, à condition d'opérer par temps couvert bien homogène afin d'éviter les tâches de lumières mobiles qui règnent en sous bois (Roussel 1953 ; Vezina 1960).

Les photographies hémisphériques

La photographie hémisphérique est un instrument d'un maniement facile, peu encombrant, peu coûteux et les photographies peuvent être collectées très rapidement. Les progrès en photographies numériques et le développement de logiciels de traitement d'images à la puissance de calcul plus importante et de plus grandes capacités de stockage, ont renouvelé l'intérêt de cette méthode (Canham 1988). Cette technique (numérique ou non) a été utilisée pour décrire la structure de la canopée, pour quantifier les radiations et le microclimat au dessous de la canopée, pour estimer le pourcentage de trouée et l'indice foliaire (Anderson 1964 ; Ducrey 1975a ; Ducrey 1975b ; Chazdon and Field 1987 ; Rich *et al.* 1993 ; Dufrêne and Bréda 1995 ; Chen *et al.* 1997 ; Bréda 2003 ; Jonckheere *et al.* 2005).

Sur le terrain, l'intensité lumineuse du couvert forestier est appréciée par le biais du pourcentage de trouée, à l'aide d'une photographie hémisphérique numérique, exploitée avec le logiciel Gap Light Analyser (GLA V2.0, Institute of Ecosystem Studies, New York, USA, site 3), qui donne pour chaque photographie un pourcentage de rayonnement transmis, exprimé par rapport au rayonnement incident théorique calculé en fonction de la position géographique du point considéré (**Annexes A et B, matériel et méthodes**).

Les photographies hémisphériques sont prises au dessus de chaque plant avec un appareil photographique (Coolpix 4500, Nikon, Japan) équipé d'un convertisseur fish-eye (FC-E8, Nikon). Cet objectif fish-eye est capable de capter les rayonnements lumineux sur 180°. La région du ciel photographiée (demi sphère) est ensuite définie en 8 classes d'azimut et 20 classes de zénith. Suivant la qualité optique de l'objectif fish-eye, la conversion de l'image hémisphérique en une image plane sera plus ou moins précise, le fish-eye optique que nous avons employé utilisait un système de projection polaire.

La photographie est orientée par rapport à la trajectoire du soleil, l'objectif est placé face au ciel, aligné sur le Nord magnétique et mis de niveau. Les photographies hémisphériques doivent être prises dans des conditions de ciel uniforme, lorsque le rayonnement est diffus : tôt le matin ou tard le soir. De nombreux logiciels d'image ont été développés pour faciliter l'exploitation des données: (Becker *et al.* 1989), Hemiview (Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK), WinSCANOPY (Regent, Instrument Inc., Quebec Canada), GLA (Frazer and Canham 1999).

Le logiciel GLA permet de calculer la structure de la canopée et sa transmission, le pourcentage d'ouverture du site, le LAI (Leaf Area Index, mesure la surface de feuille par unité de surface au sol, m^2m^{-2}), le pourcentage de radiations diffuses et directes. Le point le plus critique est sans aucun doute le seuillage qui consiste à passer d'une image en niveaux de gris à une image en deux couleurs où le noir représente la végétation, et le blanc le ciel. Cependant, même avec le logiciel GLA, le seuillage nécessite toujours une sélection manuelle, ce qui engendre une source d'erreur (du fait de la subjectivité). Dans tous les cas, afin d'éviter un biais de l'opérateur, toutes les photographies ont été exploitées par la même personne et dans les mêmes conditions. Le seuillage est fixé en utilisant l'histogramme des pixels (à la valeur de fréquence minimale) puis vérifié visuellement. Des logiciels contiennent des filtres (RBG, rouge, bleu et vert) qui permettent d'accentuer les contrastes des objets (ici le feuillage par rapport au ciel). Des études ont montré que la couleur rouge ou bleu augmente les contrastes (réduit le nombre de pixels mixtes) et donc facilite le choix du seuillage (qui devient moins critiquable) (Fernandes *et al.* 2003). Si une feuille est illuminée, elle n'est pas distinguable du contour du ciel puisque la différence de brillance est trop petite pour être détectée. En augmentant la résolution de la photographie, le mélange des pixels diminue, ce qui facilite la séparation entre le ciel et la végétation (Hale and Edwards 2002). Les photographies hémisphériques comptent 3,9 millions de pixels, elles sont prises à la plus grande résolution possible de l'appareil. De plus, miser sur une ouverture focale de 1/125 ou plus permet d'éviter les effets de mouvement des feuilles dû au vent.

Le PAR (radiations photosynthétiquement actives) diffus et direct transmis à travers la canopée au dessus de chaque plant est calculé selon l'ouverture de la canopée et s'exprime par rapport au PAR reçu au dessus de la canopée (T_{dif} et T_{dir} respectivement), (Machado and Reich 1999). Le pourcentage de rayonnement théorique transmis (GSF, $\text{GSF} = (T_{\text{dif}} + T_{\text{dir}}) / 2$), est calculé en supposant une proportion égale de radiations diffuses et directes au dessus de la canopée. Les valeurs de GSF sont moyennées sur une période commençant du 1^{er} mai (date où toutes les espèces ont débourré ou sont en train de débourrer) et finissant au 31 août (date des récoltes) pour les espèces tempérées et du 1^{er} janvier au 31 décembre pour les espèces tropicales.

2. LA TOLÉRANCE A L'OMBORAGE

2.1. Définition de la tolérance à l'ombrage

La tolérance à l'ombrage est un concept écologique employé pour décrire la capacité génétique et physiologique d'une plante à s'établir puis à persister à l'ombre. Il existe une grande variabilité interspécifique de capacité de tolérance à l'ombrage parmi les espèces ligneuses. Aux extrémités de la gamme, les espèces tolérantes à l'ombrage sont capables de se développer quand peu de lumière est disponible, elles sont sciaphiles, tandis que les espèces intolérantes à l'ombrage ne peuvent pas se développer dans des niveaux de faible lumière, elles sont héliophiles.

Des quantifications de tolérance à l'ombrage des espèces ont été établies en se basant sur les caractéristiques autécologiques des espèces, en les classant de manière relative et qualitative les unes par rapport aux autres (Baker 1949 ; Ellenberg 1979 ; Burns and Honkala 1990). Il en ressort, la notion de tempérament d'une essence, qui classe les espèces selon trois catégories : les tolérantes, les hémitolérantes et les intolérantes. Ainsi les espèces « intolérantes » nécessitent de bonnes conditions d'ouverture du couvert pour croître, les « hémitolérantes » tolèrent l'ombrage pendant quelques phases de leur cycle de vie, et les « tolérantes » peuvent se reproduire et survivre dans de faibles conditions de croissance trouvées sous fort ombrage.

La compréhension de la tolérance à l'ombrage se poursuit par l'identification de traits fonctionnels : analyse de survie, probabilité de mortalité, afin d'ajouter une approche quantitative (Kobe *et al.* 1995 ; Kobe 1996 ; Kobe and Coates 1997 ; Lin *et al.* 2002 ; Wyckoff and Clark 2000 ; Wyckoff and Clark 2002). Ces études confirment les comportements mais en plus, elles ajoutent une valeur métrique.

Plus tard, il a été suggéré que la tolérance à l'ombrage était basée sur des capacités de plus en plus élevées d'acquisition du carbone à faible intensité lumineuse (Givnish 1988 ; Messier *et al.* 1999 ; Walters and Reich 1999). Ainsi, de nombreuses études ont travaillé sur la photosynthèse et sur l'interception de la lumière (Bazzaz 1979 ; Boardman *et al.* 1981 ; Walters and Reich 1999 ; Landhäusser and Lieffers 2001). A faible niveau de lumière, le potentiel d'assimilation du carbone par unité de biomasse est plus important chez les espèces tolérantes que chez les intolérantes, ce qui expliquera la performance des espèces tolérantes en milieu ombragé (Bazzaz 1979 ; Givnish 1988). D'autres études sont en accord avec cette

hypothèse (Niinemets and Kull 1999 ; Kazda and Salzer 2000) mais d'autres non (Kitajima 1994 ; Reich *et al.* 2003).

Enfin, il est apparu que non seulement l'activité photosynthétique de la feuille devait être considérée mais aussi le gain de carbone au niveau de la plante entière et que toute la balance carbonée devait jouer un rôle (Björkman 1981 ; Reich *et al.* 2003). La survie d'un semis est assurée par le maintien d'un bilan carboné positif, c'est-à-dire qu'il assimile plus de carbone par la photosynthèse qu'il n'en dépense pour la respiration et le renouvellement des organes caduques.

La capacité de croissance à l'ombre est donc le résultat d'interactions complexes à l'échelle de la feuille et de la plante entière (Givnish 1988 ; Messier *et al.* 1999). La physiologie et la morphologie foliaire (Björkman 1981), l'allocation de biomasse à l'échelle du plant (Grubb and Metcalfe 1996) et l'architecture des semis (Canham 1988) sont considérées comme particulièrement importantes pour l'efficacité de l'utilisation de la lumière.

2.2. La tolérance à l'ombrage à l'échelle de la feuille

De nombreuses études sur l'acclimatation de la morphologie et de la physiologie de la feuille à l'ombre ont révélé des adaptations qui optimisent la capture de la lumière à l'ombre (Boardman 1977 ; Björkman 1981).

La réponse de la photosynthèse à l'éclairement chez les plantes d'ombre (o) par rapport aux plantes de lumière (l) montre une intensité lumineuse de compensation (IC) plus faible, une intensité saturante (IS) plus faible, une photosynthèse à intensité saturante (PS) plus faible, un rendement quantique apparent plus élevé (Φ) et une respiration à l'obscurité (R_0) plus faible.

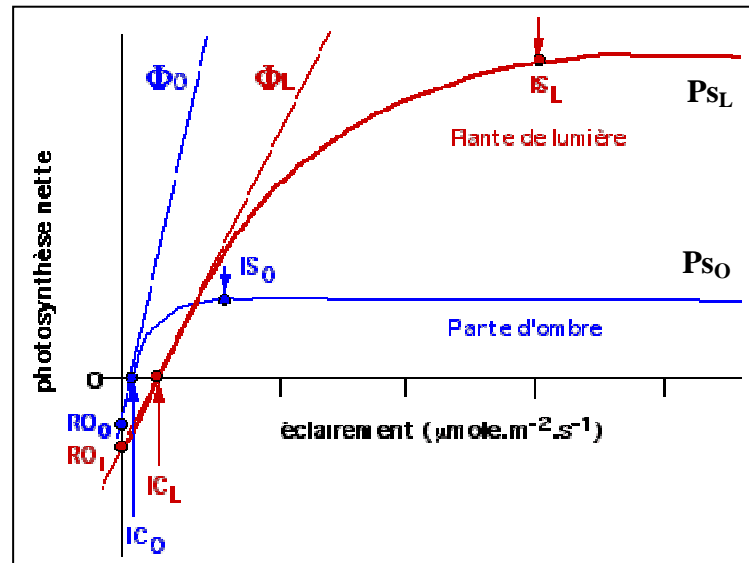


Figure 2-1 : Courbes de saturation de la photosynthèse en fonction de la densité du flux de photons chez une plante de lumière (en trait gras) et une plante d'ombre (en traits fins). Les autres facteurs (concentration en CO_2 atmosphérique, température 25°C) sont maintenus constants. IC, intensité de compensation; IS, intensité saturante ; Φ , rendement quantique foliaire (site 4).

En d'autres termes, les plantes d'ombre présentent une intensité photosynthétique optimale et une intensité de compensation plus faible, mais une efficacité dans l'absorption des photons plus élevée (plantes des sous bois). Inversement, les plantes de lumière sont moins efficaces dans la capture des photons mais elles fixent davantage de CO_2 (plantes des trouées).

A l'ombre, la diminution de l'assimilation photosynthétique à lumière saturante par unité de surface est associée à une diminution de la concentration en azote par unité de surface, qui entraîne une diminution de la concentration en chlorophylles, en protéines, en enzymes du cycle de Calvin et en particulier une diminution de la concentration de la Rubisco par unité de surface. En revanche, exprimé par unité de masse foliaire, la concentration en azote des plants d'ombre et de lumière est la même. Par contre, les plants d'ombre (ou les espèces tolérantes à l'ombrage) investissent une plus grande fraction d'azote dans l'appareil photosynthétique (Hikosaka and Terashima 1996 ; Evans and Poorter 2001). Ainsi, l'activité photosynthétique par unité de masse sèche de feuille d'ombre est beaucoup plus sensible aux changements de la surface spécifique des feuilles (SLA, m^2g^{-1}) qu'à la partition de l'azote (Evans and Poorter 2001).

De plus, l'augmentation de la surface spécifique des feuilles des plants d'ombre entraîne une diminution de la respiration par unité de surface, puisque la respiration est essentiellement

liée à la quantité de biomasse. Les feuilles d'ombre (ou des espèces tolérantes à l'ombre) ont ainsi un point de compensation plus faible que les espèces intolérantes (Loach 1967 ; Boardman 1977; Bazzaz 1979). Les feuilles d'ombre sont capables de maintenir un bilan carboné positif à des intensités lumineuses plus faibles que les feuilles de lumière. Ces résultats montrent que ce n'est pas l'acquisition du carbone qui permet d'expliquer la tolérance à l'ombrage, mais plutôt la surface spécifique des feuilles (Kitajima 1994 ; Landhäusser and Lieffers 2001 ; Reich *et al.* 2003).

Une hypothèse formule que plus une espèce est tolérante à l'ombre, plus sa surface spécifique est grande (Givnish 1988). Cet investissement préférentiel du carbone pour la surface des feuilles permettra d'augmenter l'interception (Percy and Sims 1994 ; Reich *et al.* 1998). Or, tout en augmentant le gain de carbone, cette diminution de l'épaisseur des feuilles augmente leur fragilité et leur vulnérabilité face aux herbivores (Kitajima 1994 ; Poorter and de Jong 1999 ; Walters and Reich 1999 ; Reich *et al.* 2003). De plus, l'augmentation de la surface spécifique des feuilles avec l'ombrage s'accompagne souvent d'une diminution de la densité des feuilles (Chabot *et al.* 1979 ; Griffin 1994 ; Veneklaas and Poorter 1998). Les observations sont assez diverses à ce sujet : certaines ont effectivement répertorié de grandes surfaces spécifiques des feuilles chez les espèces tolérantes par rapport aux espèces intolérantes (Niinemets 1997 ; Beaudet and Messier 1998 ; Niinemets 1998 ; King 2003), tandis que d'autres ont observé l'inverse (Kitajima 1994 ; Poorter *et al.* 1997 ; Walters and Reich 1999 ; Reich *et al.* 2003). Mais suivant les études et les espèces, la comparaison ne pouvait se faire exclusivement sur le même climat lumineux.

2.3. La tolérance à l'ombrage à l'échelle de la plante entière

La forme de la couronne, l'arrangement des branches, le nombre de feuilles, la taille et la forme des feuilles, la distribution et l'orientation des feuilles contribuent à modifier l'efficacité d'interception de la surface foliaire.

L'architecture des semis est donc un élément déterminant pour la capture de la lumière (Canham 1988). L'efficacité d'interception de la lumière d'une couronne est caractérisée par un indice, le STAR (Shoot silhouette by Total leaf Area Ratio). Il s'agit du rapport entre la surface foliaire totale et la surface foliaire effectivement interceptrice (pour une orientation du soleil donnée et intégrée sur l'ensemble de son parcours). Ce rapport varie en fonction de

la géométrie de la tige feuillée de l'orientation relative des feuilles (ou aiguilles) et des directions de la lumière. Habituellement, les tiges feuillées situées à l'ombre ont un plus grand STAR que celles se situant à la lumière (Stenberg 1996). Les tiges feuillées d'ombre tendent à s'étaler et à s'incliner horizontalement en favorisant la croissance des branches latérales pour intercepter un maximum de lumière (Planchais and Sinoquet 1998 ; Farque *et al.* 2001). Ainsi, une architecture plus plagiotrope limite l'auto-ombrage et augmente l'efficacité d'interception de la lumière (Millet *et al.* 1998). Pourtant de nombreuses études montrent qu'il n'y a pas particulièrement de différences interspécifiques d'interception de la lumière entre les espèces tolérantes et les espèces intolérantes à l'ombrage (Poorter and Werger 1999 ; Valladares *et al.* 2002 ; Pearcy *et al.* 2004; Delagrangé *et al.* 2006).

Les différences entre les espèces tolérantes et intolérantes se situent plus au niveau de la plasticité morphologique. Les espèces tolérantes sont davantage capables de modifier l'architecture de leur couronne que les espèces intolérantes, ceci leur permettant d'augmenter l'interception de la lumière dans des environnements ombragés. Les espèces intolérantes montrent moins de plasticité morphologique, avec une croissance en hauteur et une forte dominance apicale (Messier and Puttonen 1995 ; Chen *et al.* 1996).

La croissance et la survie des semis en sous bois est fortement influencée par l'allocation de biomasse entre les organes au dessus et au dessous du sol. Les plants d'ombre ou les espèces tolérantes à l'ombrage allouent plus de biomasse à la partie aérienne (surtout dans les feuilles) que les plants de lumière ou que les espèces intolérantes (Welandér and Ottosson 1998 ; Valladares *et al.* 2002). Ce changement d'allocation de biomasse au bénéfice des feuilles augmente le LAR (surface relative du plant m^2g^{-1}) et permet une meilleure interception. Or, un investissement coûteux pour produire des feuilles (organes les plus coûteux) diminue le stock possible de composés qui pourrait aider la plante à lutter contre les dommages (les composés phénoliques par exemple). Néanmoins, l'allocation du carbone à la tige feuillée au dépend du système racinaire n'est pas considérée comme un trait adaptatif de la tolérance à l'ombrage (Givnish 1988 ; Reich *et al.* 1998 ; Lambers *et al.* 1999).

Les études à l'échelle de la plante entière ont montré combien il était important de considérer la tolérance à l'ombrage à différents stades de vie de la plante, dans la mesure où celle-ci varie fortement (Kneeshaw *et al.* 2006). Les différences de tolérance à l'ombrage entre les espèces s'estompent avec la taille et la plupart des espèces deviennent moins tolérantes lorsqu'elles grandissent. L'augmentation de la taille de l'individu entraîne une diminution du LAR et donc du rapport entre la biomasse photosynthétique et la biomasse non photosynthétique. Ainsi, les coûts de construction, et surtout les coûts de maintenance,

augmentent avec la taille de la plante. Ces caractéristiques ne favorisent pas le maintien d'un bilan carboné positif (Givnish 1988). Pour chaque espèce et pour chaque niveau d'éclairement, il y a une taille maximum permettant le maintien d'un bilan carboné positif (King 1990 ; Messier *et al.* 1999).

Ainsi, l'équilibre carboné de la plante entière dépend non seulement de la capacité photosynthétique des différentes feuilles, mais également de leur capacité à intercepter l'énergie lumineuse et des coûts énergiques pour produire et maintenir la surface assimilatrice et les organes non photosynthétiques. Tandis que beaucoup de chercheurs conviennent que la tolérance à l'ombrage change considérablement parmi les espèces, les discussions sur les origines physiologiques et morphologiques de ces différences persistent.

3. LE COUT DE CONSTRUCTION

3.1. Définition du coût de construction

A partir de la photosynthèse, la plante élabore des substrats (du glucose). Une partie de ce glucose est utilisé pour la respiration qui fournit de l'énergie. Cette énergie est utilisée, soit pour la maintenance de la biomasse existante et pour l'absorption des minéraux, soit pour la croissance, c'est à dire pour les processus de biosynthèse associés à la production de la nouvelle biomasse. L'énergie nécessaire à la croissance et à la maintenance correspond à de l'ATP et des réducteurs (NAD(P)H). Enfin, l'autre partie des substrats, apporte les squelettes carbonés qui servent à la production de diverses molécules (acides organiques, sucres structuraux et non structuraux, lignines, protéines, phénols, lipides). Le coût de construction correspond au carbone investi pour fournir une nouvelle croissance c'est à dire des squelettes carbonés et de la respiration de croissance associée à la réduction de ces squelettes.

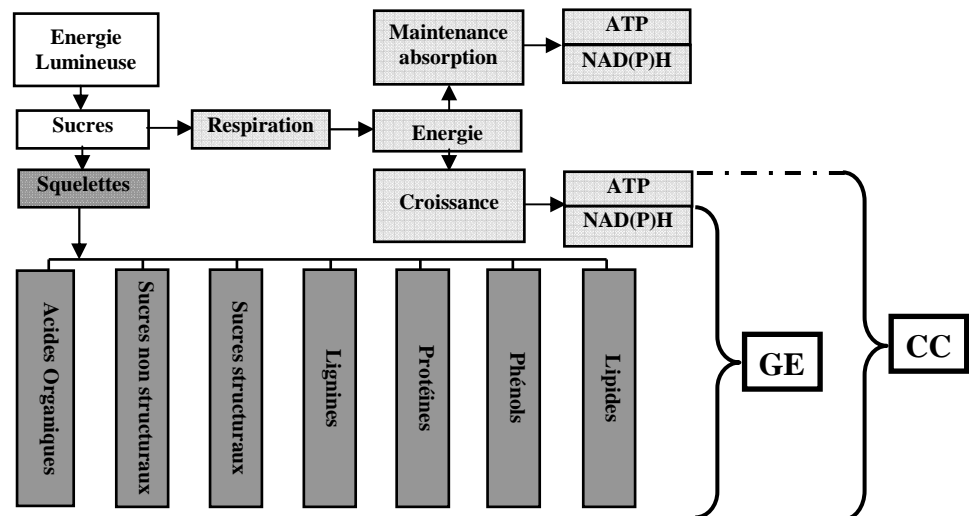


Figure 3-1: Représentation du devenir du glucose produit par la photosynthèse entre la respiration de maintenance, la respiration de croissance et la fourniture des squelettes carbonés. Le coût de construction (CC) est la somme du carbone investi pour la respiration de croissance et la fourniture des squelettes carbonés. Le glucose équivalent (GE) prend en compte le degré d'oxydation de la matière organique (les réducteurs, NAD(P)H) mais ne prend pas en compte la quantité d'ATP exigée pour les réactions biochimiques.

Le gain de carbone d'une plante entière, exprimé par unité de biomasse, intégré sur une journée, est représenté Figure 3-2. Une fraction du carbone fixé pendant la journée est respirée à nouveau. Cette respiration est employée pour fournir l'énergie et/ou la puissance réductrice nécessaire à la maintenance (pour le prélèvement des minéraux par les racines et pour le transport des composés). La fraction restante correspond au carbone investi pour une nouvelle croissance qui inclut la fourniture des squelettes carbonés et la respiration associée à la réduction de ces squelettes.

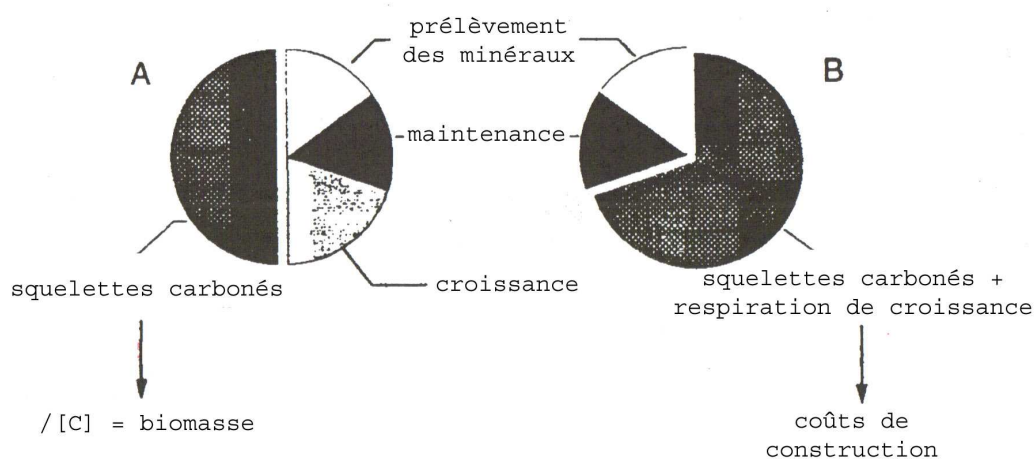


Figure 3-2 : Représentation du gain carboné total et du devenir du glucose fixé. (A) Séparation du glucose dépensé pour la respiration et du glucose investi dans les squelettes carbonés. (B) Séparation du glucose dépensé pour la respiration de maintenance et le prélèvement des nutriments, et du coût de construction (respiration de croissance plus squelettes carbonés) adaptation de Poorter and Villar (1997).

Le coût de construction se définit comme étant la quantité de glucose nécessaire à la fabrication d'un gramme de biomasse (de tige, de feuille, de racine, etc.), (Penning De Vries *et al.* 1974). Pour chaque grande classe de composés biochimiques (lipides, lignines, protéine, etc.), une quantité de glucose est exigée pour produire les squelettes carbonés et pour fournir l'énergie nécessaire (ATP et NAD(P)H) aux réactions selon la voie biosynthétique la plus probable. Il existe actuellement quatre méthodes de détermination du coût de construction.

3.2. Méthodes d'estimation du coût de construction

- *Estimation du coût par analyse de la composition chimique*

Il s'agit ici de déterminer la composition biochimique totale (Merino *et al.* 1984 ; Lafitte and Loomis 1988 ; Poorter and Bergkotte 1992) et de pondérer chaque concentration de composé par son coût, calculé selon la voie biosynthétique la plus probable. L'ensemble sommé fournit le coût de construction de l'organe ou de la plante considéré(e). Cette détermination ne peut être exhaustive et repose sur l'identification de groupes de composés ayant des coûts de construction similaires. Poorter utilise les catégories de composés biochimiques suivantes :

Tableau 3-1 : Taux de glucose nécessaire pour fabriquer un gramme des différentes classes de composés biochimiques, selon Penning de Vries 1983.

Groupes de composés	Coût de construction (g glucose.g ⁻¹)
Lipides	3,03
Phénols solubles	2,60
Protéines (issues du NO ₃ ⁻)	2,48
Lignine	2,12
Sucres totaux structuraux (TSC)	1,22
Sucres totaux non structuraux (TNC)	1,09
Acides organiques	0,91
Minéraux	0

Un exemple détaillé du cheminement permettant d'obtenir le coût de construction de la lignine est détaillé dans le travail d' Amthor (2003). Il estime la quantité de glucose nécessaire à la fabrication de 1g de lignine. Sachant que la lignine est un dérivé de 3 alcools monomères (alcool p-coumarylique, alcool coniferylique et alcool sinapylique), il analyse d'abord les réactions biosynthétiques responsables de la synthèse de ces 3 monomères à partir du glucose. Puis, il analyse la polymérisation de ces monomères pour former la lignine, en incluant dans les calculs la respiration nécessaire pour fournir les NAD(P)H et les ATP nécessaires à la biosynthèse et à la polymérisation des monomères.

Les différences de coût de construction des composés constituant une même classe de composés sont de l'ordre de 5%, elles sont petites comparées aux différences de coût de construction qui séparent les différentes classes de composés (qui peuvent différer d'un facteur 3), (Penning De Vries *et al.* 1974). Bien que la fraction minérale ne nécessite ni énergie ni squelette carboné (car elle n'est pas synthétisée dans la plante), son absorption par les racines et son transport dans la plante requière de l'énergie. Or, ces coûts de transport et d'absorption sont assimilés à des processus de maintenance. Ainsi, aucun glucose n'est considéré nécessaire pour leur construction.

Équation 3-1 : Détermination du coût de construction d'après la méthode biochimique

$$CC_{TOT} = CC_{LIP} \times LIP + CC_{PHE} \times PHE + CC_{PROT} \times PROT + CC_{LIG} \times LIG + CC_{TSC} \times TSC \\ + CC_{TNC} \times TNC + CC_{AO} \times AO$$

CC_{TOT} : Coût de construction total de l'organe ou du plant considéré (g glucose g⁻¹ MS)

LIP, PHE, PROT, LIG, TSC, TNC, AO: concentration en lipides, composés phénoliques, protéines, lignines, sucres structuraux, sucres non structuraux et acides organiques de l'organe ou du plant considéré (g g⁻¹ MS)

CC_{LIP} , CC_{PHE} , CC_{PROT} , CC_{LIG} , CC_{TSC} , CC_{TNC} , CC_{AO} : coût de construction des lipides, composés phénoliques, protéines, lignines, sucres structuraux, sucres non structuraux et acides organiques (g glucose g⁻¹ MS)

Les coût de construction des lipides, composés phénoliques, protéines, lignines, sucres structuraux, sucres non structuraux et acides organiques sont des constantes indiquées dans le Tableau 3-1. Les méthodes de dosage des différents groupes de composés biochimiques sont précisées en **Annexe F**.

L'avantage de cette méthode est qu'en comparant différentes espèces ou traitements, si des différences de CC sont observées, il est possible de savoir quelles classes de composés sont à l'origine de ces différences. Par contre, le coût des différents composés est calculé selon le chemin biosynthétique le plus probable, or il n'est pas certain que la biosynthèse suive systématiquement cette voie. De plus, les déterminations biochimiques nécessaires pour ce type d'analyse sont plutôt laborieuses, il est difficile de récupérer et de séparer complètement et précisément tous les composés biochimiques dans le tissu. En sommant l'ensemble des 8 classes de composés Merino *et al.* (1984) n'obtient que 70% de la masse de ses échantillons

de feuille. Ceci limite l'exactitude avec laquelle le coût de construction d'un tissu peut être déterminé. Pour toutes ces raisons, des méthodes plus rapides et plus faciles ont été mises au point.

- ***Estimation du coût par analyse de la composition élémentaire***

Basés sur l'observation que les composés coûteux sont généralement plus réduits que le glucose et les composés peu coûteux sont plus oxydés, McDermitt and Loomis (1981) ont constaté que le coût de construction était étroitement lié à l'état d'oxydation/réduction de la biomasse. À partir de la composition élémentaire, du degré d'oxydation de chaque atome de C, H, O, N, S constituant la biomasse et de la forme de l'azote absorbé, ils ont calculé le degré de réduction (r) de la matière végétale.

Équation 3-2 : Calcul du degré de réduction de la matière végétale

$$r = 4c + h - 2x + kn + ms$$

r : degré de réduction de la matière végétale (mol d'électron g^{-1}MS)

c, h, x, n, s : nombre de moles de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et de soufre dans la MS ($\text{mol g}^{-1}\text{MS}$)

k : différence de degré d'oxydation entre l'azote source ($k = +5$ pour NO_3^- et $k = -3$ pour NH_4^+) et l'azote final (N_2).

m : différence de degré d'oxydation entre le soufre source ($m = +6$ pour SO_4^{2-}) et le soufre final.

Le terme « équivalent de glucose » (GE) dénote le nombre de moles de glucose exigé pour fournir les squelettes carbonés. Comme l'oxydation complète d'une mole de glucose libère 24 moles d'électrons, le GE est calculé à l'aide de l'Équation 3-3.

Équation 3-3 : Calcul des équivalents en glucose (GE) nécessaires à la formation du squelette carboné

$$GE = \frac{r}{24}$$

GE : équivalent de glucose (mol glucose g⁻¹ MS)

r : degré de réduction de la matière végétale (mol d'électron g⁻¹ MS)

24 : nombre de moles d'électrons libérées lors de l'oxydation complète d'une mole de glucose.

Si on reprend la Figure 3-1, l'estimation de GE prend en compte le degré d'oxydation de la matière organique (les réducteurs, NAD(P)H), mais ne prend pas en compte la quantité d'ATP exigée pour les réactions biochimiques. Le GE est calculé d'après le stade de réduction de la molécule considérée tandis que le CC est calculé d'après la voie biosynthétique la plus probable. Le t

Tableau 3-2 expose pour différentes molécules le rapport entre le CC et le GE.

Tableau 3-2 : Equivalent en glucose (GE) et coût de construction (CC) et efficacité de biosynthèse (Eg) pour différents constituants de plantes. Le GE est calculé d'après la composition élémentaire de la molécule. Le CC est calculé selon le chemin biosynthétique le plus probable. Eg est le rapport GE/CC, d'après Williams et al., (1987).

Composé	GE (g glucose g ⁻¹)	CC (g glucose g ⁻¹)	Efficacité de biosynthèse (Eg)
Acides organiques	0,852	0,852	1
Acides caprylic	2,290	2,412	0,950
Diplacol	1,943	2,310	0,841
Lignine	2,063	2,431	0,849
Hemicellulose	1,132	1,296	0,874
Monoterpène	2,663	2,868	0,928
Tannin	1,471	1,591	0,924

Il a été convenu de fixer un même facteur de correction entre le GE et le CC quelque soit la composition chimique du matériel végétal. L'efficacité de biosynthèse (Eg) est ainsi estimée à 0,89 (Williams *et al.* 1987). Eg représente la fraction du coût provenant des réducteurs qui ne sont pas incorporés dans la biomasse, mais qui ont fourni l'ATP.

Équation 3-4 : Calcul du coût de construction d'après la composition élémentaire

$$CC = \frac{[GE] \times [180,15]}{E_g}$$

CC : coût de construction (g glucose g⁻¹ MS)

GE : équivalent en glucose (mol g⁻¹ MS)

180,15 : masse molaire du glucose (g mol⁻¹)

E_g : efficacité de biosynthèse 0,89 (Williams et al. 1987)

Cette méthode a l'avantage de nécessiter peu d'analyses. Elle est toutefois limitée par le coût élevé de l'analyse élémentaire. La détermination d'oxygène par pyrolyse peut provoquer des problèmes, dus à la formation des oxydes (Lafitte and Loomis 1988).

- ***Estimation du coût par la chaleur de combustion***

De la même manière que pour la méthode basée sur l'analyse élémentaire, cette méthode est basée sur l'estimation du GE (équivalent en glucose). La quantité d'électron est également un facteur prédictif de la chaleur de la combustion puisque la chaleur libérée pendant les mesures calorifiques est le résultat de l'oxydation complète du matériel. Cette oxydation complète correspond au déplacement d'électron d'une liaison de type méthane (C–H) à une liaison de type dioxyde de carbone (C=O).

Pour utiliser la méthode calorimétrique, il suffit de déterminer la concentration en azote organique, la teneur en cendres et la chaleur de combustion du matériel végétal (en brûlant un gramme de biomasse dans un microcalorimètre et en mesurant la chaleur qui s'en dégage). Plus il y a de chaleur dégagée, plus le coût de construction est élevé. Ainsi, brûler un gramme de lipides, libère plus d'énergie que de brûler un gramme de sucres non structuraux (glucose, fructose, sucrose).

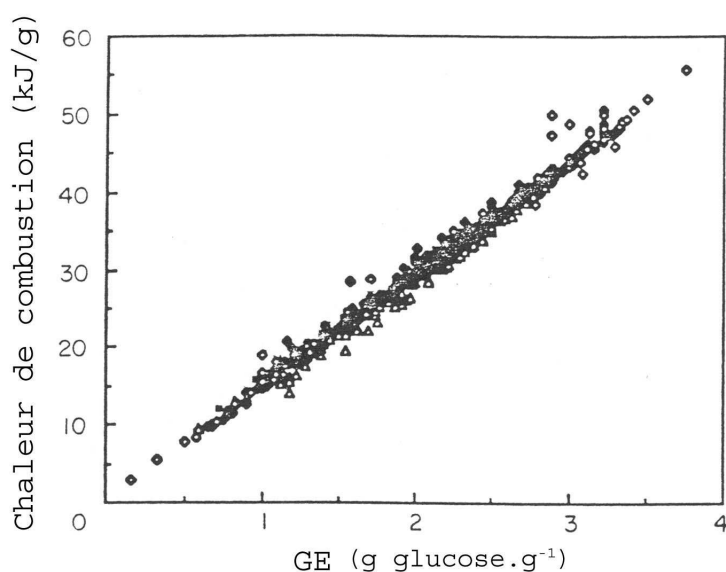


Figure 3-3 : Corrélation entre la chaleur de combustion (ΔH_c) et les équivalents en glucose (GE) pour 545 composés organiques. Les données contenant du soufre sont issues de Cox et Pilcher in Williams *et al.* (1987), toutes les autres sont issues de Weast, (1975) in Williams *et al.* (1987). Les valeurs de GE pour les composés contenant du soufre sont calculées avec SO_2 et H_2SO_4 comme produit issus de la combustion. La différence de chaleur dégagée entre ces deux réactions est estimée à $303,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ S}$ (Baker et al. 1955 in Williams *et al.* 1987). Les données contenant de l'azote lié directement à l'oxygène ($n = 22$) d'autres forme d'azote ($n = 102$) ou du soufre ($n = 134$) sont réparties séparément de celles ne contenant que du carbone, hydrogène et/ou Oxygène ($n = 287$). CH(O) : losanges blancs ; CH(O)N losanges noirs ; CH(ON)S ($m = +4$) : triangles blancs et CH(ON)S ($m = +6$) : carrés noirs, in Williams *et al.* 1987.

Pour l'azote, le produit final de combustion étant N_2 son degré d'oxydation est égal à 0. Néanmoins, une partie peut produire de l'acide nitrique (degré d'oxydation +5) mais l'erreur commise en considérant que tout l'azote se retrouve sous forme de N_2 reste marginale (< 0,5%).

De même pour le soufre, les produits finaux de combustion sont SO_2 et H_2SO_4 (degré d'oxydation respectivement +4 et +6). On considère que le produit final est H_2SO_4 , il n'y a pas lieu de tenir compte de la concentration en S dans la calcul du coût de construction puisque que c'est le même degré d'oxydation de la source et l'erreur commise est négligeable compte tenu des faibles concentrations en S dans les tissus végétaux.

Équation 3-5 : Calcul du coût de construction d'après la chaleur de combustion

$$CC = \frac{(0,06968 \times \Delta H_c - 0,065) \times (1 - MIN) + \frac{k \times N_{org}}{14,0067} \times \frac{180,15}{24}}{Eg}$$

CC : coût de construction (g glucose g⁻¹)

ΔH_c : chaleur de combustion de l'échantillon (kJ g⁻¹)

Min : minéraux (g g⁻¹MS)

N_{org} : azote organique (g g⁻¹MS)

n : degré d'oxydation de l'azote source (n = +5 pour NO₃⁻ et n = -3 pour NH₄⁺)

n' : degré d'oxydation de l'azote final ; n' = 0 (car le produit final est le N₂)

k : différence de degré d'oxydation de l'azote entre la source et le produit final

$$k = n - n' \text{ or } n' = 0 \text{ donc } k = n$$

180,15 : masse molaire du glucose (g mol⁻¹)

14,0067 : masse molaire de l'azote (g mol⁻¹)

24 : nombre d'électrons impliqués dans la réduction d'une mole de glucose

E_g : efficacité de biosynthèse 0,89 (Williams *et al.* 1987)

La première partie du premier terme de l'équation correspond à la corrélation entre les équivalents en glucose (GE) et la chaleur de combustion de la matière organique (Figure 3-3 ; Williams *et al.* 1987). La deuxième partie du premier terme permet d'exprimer la relation par rapport à la matière sèche, puisque la matière végétale contient des minéraux. La deuxième partie de l'équation corrige par rapport à l'azote contenu dans la biomasse. Le tout est divisé par E_g (efficacité de biosynthèse) qui est le rapport entre l'énergie contenue dans les tissus et l'énergie nécessaire à leurs synthèses. E_g permet ainsi de convertir l'équivalent glucose (GE) en coût de construction (CC).

La méthode calorimétrique est plus rapide à mettre en oeuvre que la méthode biochimique. Elle nécessite toutefois un calibrage du microcalorimètre (**Annexe D**). Encore une fois, la relation est compliquée par l'utilisation de l'efficacité de biosynthèse (qui est un paramètre estimé). Hélas, comme toutes les méthodes rapides il y a un inconvénient, il s'agit d'une approche globale et si des différences de CC sont observées, l'origine biochimique de ces différences reste inconnue.

• *Estimation du coût par la teneur en carbone*

L'état de réduction des différents composés est corrélé à leur teneur en carbone (Vertregt and Penning De Vries 1987). La teneur en cendres, en azote et en carbone de la matière végétale suffit à évaluer le coût de construction. La corrélation entre la teneur en carbone et le coût de construction d'un certain nombre de composés est montrée dans la

Figure 3-4.

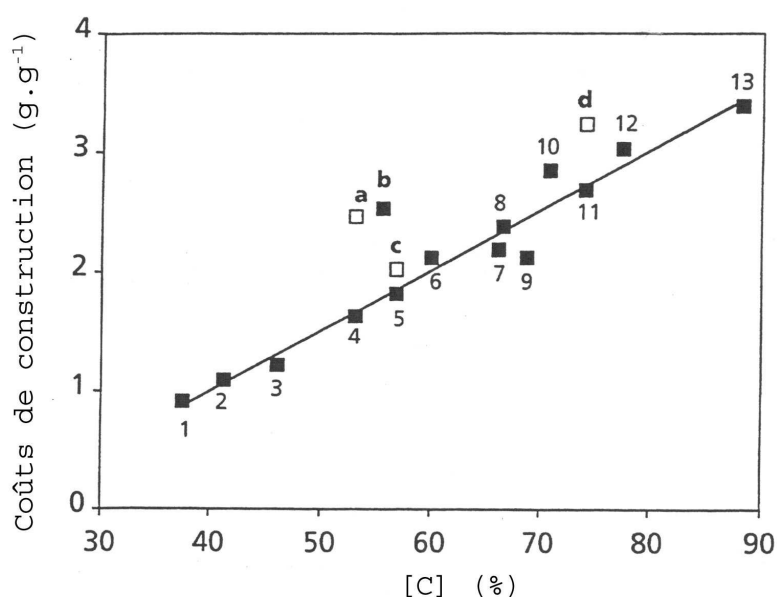


Figure 3-4 : Rapport entre le coût de construction et la teneur en carbone des composés modèles de divers groupes de constituants de la biomasse de la plante. 1. Acides organiques ; 2. Glucose/sucrose/amidon ; 3. (Hémi)cellulose ; 4. Protéines (issu de NH_4^+) ; 5. Prunasine (un glucoside cyanogénique) ; 6. Acide caféique (un phénol) ; 7. Chalcone de Narrengenin (un flavonoïde) ; 8. Umbelliféron (une coumarine) ; 9. Lignine ; 10. Diplacol (un favonoïde) 11. nicotine ; (issu de NH_4^+ , un alcaloïde ; 12. Lipides ; 13. Limonène (un monoterpène) ; a. Protéine (issu de NO_3^-) ; b. Acide Ellagig (un tanin) ; c. Prunasin (issu de NO_3^-) ; d. Nicotine (issu de NO_3^-). La ligne de régression est adaptée pour les points de 1 à 13. Des coûts de construction sont issus Penning Vries et al. (1974 ; 1983), Merino et al. (1984) ; Lambers et Rychter (1989). Les coûts pour l'acide ellagig sont une expérimentation (Lambers and Rychter 1989).

Cette régression n'est valable que si NH_4^+ est la source exclusive d'azote. Si l'azote est issu de NO_3^- , le coût des protéines (points a et d) se situe bien au-dessus de la régression et la régression n'est plus valide. Dans de telles situations, l'azote organique (N_{org}) doit être

déterminé séparément, la formule inclut alors un coût additionnel pour la réduction des nitrates.

Équation 3-6 : Calcul du coût de construction d'après la teneur en carbone

$$CC = \left[-1,041 + 5,077 \times \frac{C_{tot}}{(1 - MIN)} \right] \times (1 - MIN) + 5,325 \times N_{org}$$

CC : coût de construction (g glucose g⁻¹ MS)

C_{tot} et N_{org} : contenu en carbone total et en azote organique (g g⁻¹ MS)

MIN : contenu en minéraux (g g⁻¹ MS)

MS : matière sèche (g)

La première partie du premier terme correspond à l'équation de la droite de la Figure 3-4 (Poorter 1994). La seconde partie du premier terme corrige d'après les minéraux contenus dans la biomasse. Le second terme correspond au coût additionnel pour la réduction des nitrates. C_{tot} et N_{tot} : sont déterminés par analyse élémentaire (**Annexe F**). En déterminant séparément la concentration en nitrates, il est possible de déterminer la concentration en N organique (N_{org}) à partir de N_{tot} . Les minéraux peuvent être assimilés aux cendres (déterminés par calcination). Cette méthode est simple, rapide et peu coûteuse.

• **Comparaisons des différentes méthodes d'estimation du coût**

Williams *et al.* (1987) ont comparé 3 méthodes d'estimation du coût de construction : la méthode basée sur l'analyse biochimique, la méthode basée sur l'analyse élémentaire et la méthode basée sur la chaleur de combustion. Selon ces 3 méthodes ils ont estimé les coûts de construction des feuilles d'arbustes du maquis Californien (*chaparral*). Les deux méthodes basées sur l'estimation du GE (analyse élémentaire et chaleur de combustion) étaient très fortement corrélées, la calorimétrie avait toutefois tendance à surestimer les valeurs de coût de construction par rapport à l'analyse élémentaire. La méthode biochimique surestimait de 20% à 22% le coût par rapport à la méthode basée sur la microcalorimétrie. Cette différence a été attribuée aux sources d'erreur multiples accompagnant les nombreuses analyses biochimiques. Plus tard, ces 3 méthodes d'estimation du coût de construction ont été

comparées en y ajoutant la méthode basée sur la teneur en carbone (Lafitte and Loomis 1988). Finalement, la méthode basée sur l'analyse élémentaire donne les plus basses estimations, suivies de la méthode du carbone de Vertregt and Penning De Vries (1987), puis la méthode de la chaleur de combustion et finalement la méthode de l'analyse de la composition biochimique de Vertregt and Penning De Vries (1987).

Ici, j'ai comparé les valeurs de coût de construction obtenues par la méthode du contenu en carbone avec celles obtenues par la méthode calorimétrique, sur 29 échantillons couvrant une large gamme de valeurs de coût de construction (de feuilles, de pétioles, de tiges et de racines de deux espèces tempérées). Les deux méthodes sont bien corrélées ($r^2 = 0.89$, $n = 29$, $p < 0.0001$) mais la méthode calorimétrique a tendance à donner des valeurs de coût de construction plus faibles que celle basée du pourcentage de carbone (**Annexe A**). Les différences de valeur entre les deux méthodes sont de l'ordre de 13 % (en moyenne $1,16 \pm 0,09$ g glucose g^{-1} MS en microcalorimétrie contre $1,29 \pm 0,10$ g glucose g^{-1} MS à partir de la teneur en carbone). Ces différences peuvent être dues aux conditions d'étalonnage du microcalorimètre.

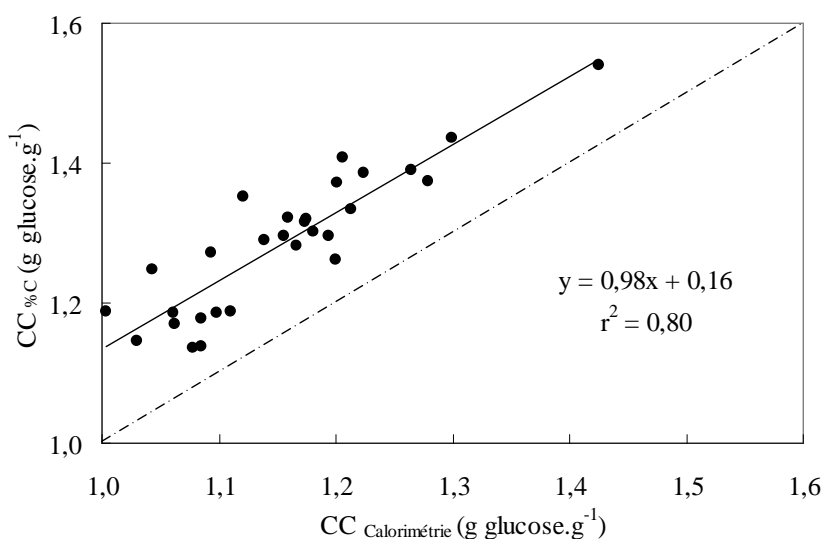


Figure 3-5 : Corrélation entre le coût de construction (g glucose g^{-1} MS) estimé par calorimétrie (Williams et al., 1987) et estimé par la méthode de la teneur en carbone (Vertregt et Penning de Vries, 1987) sur différents organes (feuilles, tiges, pétioles et rachis) de deux espèces tempérées (*A. platanoides* et *F. excelsior*) récoltées sur le site du Graouilly ($n = 29$). La bissectrice est représentée en pointillés.

Un résultat similaire a été obtenu sur des échantillons de chêne pédonculé cultivés sous ombrières (Barthod and Epron, 2001, non publié). Les valeurs de coût de construction

obtenues avec les deux méthodes étaient également fortement corrélées ($r^2 = 0,76$; $p < 0,001$).

3.3. Les déterminants biochimiques du coût de construction

Dans cette étude, la méthode du contenu carboné a été choisie pour analyser le coût de construction. Cette méthode nécessite la détermination du contenu en minéraux, en azote organique et en carbone total.

- *Les cendres et les minéraux*

Normalement, le contenu en minéraux (MIN) est calculé à partir des contenus en cendres, en nitrates et en carbonates car la masse des cendres ne reflète pas directement la minéralo-masse. Lors de la calcination, les nitrates se volatilisent, la perte de ceux-ci entraîne une sous-estimation du poids des minéraux. A l'inverse, lors de la calcination, des carbonates issus de la réaction des acides organiques avec le dioxyde de carbone atmosphériques apparaissent. Ceci entraîne une surestimation du poids des minéraux. Ces deux corrections se compensent partiellement. Comme les dosages des carbonates (par titrage acido-basique) et des nitrates (par spectrophotométrie) sont relativement longs et que les minéraux ne représentent que 5% de la biomasse végétale, les minéraux sont assimilés aux cendres (**Annexe F**). Cette approximation d'utiliser les cendres au lieu des minéraux entraîne une surestimation du CC de 1,5% en moyenne.

- *L'azote et les protéines*

Le contenu en protéine (PROT) est calculé à partir de N_{org} en considérant qu'il y a en moyenne 0,16 gramme de N par gramme de protéine (**Annexe F**).

L'azote organique correspond à l'azote total auquel il convient de soustraire l'azote inorganique (les nitrates). Les nitrates ne représentent en général que quelques pourcent de l'azote total. Assimiler l'azote total à l'azote organique entraîne une surestimation du CC de 0,3% en moyenne.

L'azote total et le carbone total ont été dosés par analyseur élémentaire dont la précision absolue est de $\pm 0,2\%$ (**Annexe F**). L'erreur due à l'analyseur élémentaire sur l'azote entraîne

une erreur de 0,02% sur le CC. L'erreur due à l'analyseur élémentaire sur le carbone entraîne une erreur de 0,3% sur le CC.

Le problème concernant la nature de la nutrition azotée de la plante est plus délicat à résoudre. Si l'azote provient exclusivement de NH_4^+ la plante n'a pas besoin de fournir d'énergie pour réduire les NO_3^- en NH_4^+ . Par contre si l'azote provient des NO_3^- et si il est réduit dans les tiges ou les racines, ce coût de réduction doit alors être inclus. La réduction des NO_3^- dans les feuilles (durant la période diurne) se fait au dépend des équivalents réducteurs générés dans les chloroplastes. Par contre si la réduction a lieu dans les organes non photosynthétiques ou dans les feuilles à l'obscurité, la réduction des NO_3^- utilise le pouvoir réducteur généré par l'oxydation du glucose. Lorsque les racines des plants sont exposées aux deux formes d'azote (NO_3^- et NH_4^+) il est difficile de déterminer le ratio de NO_3^- et NH_4^+ prélevé. Dans ce cas, soit les études supposent que les nitrates sont la source exclusive d'azote, soit les études supposent une alimentation ammoniacale (ou une réduction photosynthétique des nitrates). Dans le premier cas, les études conduisent à une estimation haute du coût de construction, dans le deuxième cas, les études ne considèrent pas le coût de réduction des nitrates, elles conduisent à une estimation basse du coût de construction. Dans notre étude, nous avons calculé le coût de construction en considérant une nutrition ammoniacale et donné systématiquement la valeur correspondant à une nutrition sous forme de nitrate, sachant que la valeur vraie se situe entre les deux.

Pour résoudre ce problème, l'une des solutions serait de travailler sur sol acide (un sol de source exclusivement ammoniacale). Une autre solution serait de vérifier en conditions contrôlées la préférence nutritionnelle de chaque espèce étudiée or nous avons choisi de travailler in situ.

Pour vérifier la nature de la nutrition azotée, la composition isotopique en azote des feuilles a été déterminée. Lors du processus de minéralisation et de nitrification de l'azote, un fractionnement isotopique se produit durant lequel les molécules contenant le ^{14}N se transforment plus rapidement que celles contenant du ^{15}N . Le résultat est que le N de la matière organique est plus riche en ^{15}N que le N de l'ammoniaque et lui-même plus riche que le N des nitrates. Comme l'abondance naturelle en ^{15}N mesurée dans une plante est proche de celle de sa source d'azote, l'utilisation des mesures isotopiques ^{15}N sur les feuilles fournit des informations sur l'acquisition de l'azote par la plante. Cet outil est particulièrement bien adapté pour la mise en évidence de différences interspécifiques de nutrition azotée.

Les signatures isotopiques semblables de N dans des feuilles d'ombre et de lumière du hêtre et de l'érable sycomore soutiennent l'hypothèse que les plantes emploient la même source de l'azote quelque soit le climat lumineux. En revanche les différences de signatures isotopiques de N dans des feuilles des différentes espèces laissent supposer des nutriments azotés différentes.

Ainsi, lorsqu'il s'agit d'étudier la plasticité d'une même espèce les erreurs faites sur de CC des plants d'ombres et de lumière sont les mêmes (puisque la nutrition est la même), la comparaison intraspécifique n'est pas erronée (en valeurs relatives). En revanche comme les espèces n'utilisent pas la même source d'azote, l'erreur faite sur le CC de chaque espèce n'est pas la même, les comparaisons interspécifiques restent délicates.

- ***Les composés phénoliques***

Les phénols solubles sont extraits du matériel végétal avec une solution de méthanol, puis dosés par colorimétrie avec le réactif de Folin Ciocalteu (**Annexe F**). Les phénols sont des composés coûteux et sont connus pour varier avec le climat lumineux. Un de leur nombreux rôle étant de protéger la feuille contre les rayonnements UV. Dans le cadre de cette étude, il est donc important de bien les déterminer.

Les composés phénoliques présents dans la feuille sont extrêmement difficiles à doser puisque chaque méthode est plus ou moins spécifique d'une catégorie de composés phénoliques. La plupart des méthodes nécessitent en premier lieu l'extraction des composés phénoliques, or certains phénols protègent la feuille des rayonnements UV et sont insolubles tandis que d'autres, situés dans le mésophile sont solubles mais ne protègent pas la feuille contre les rayonnements UV. De plus, ces méthodes qui nécessitent une extraction prennent du temps. Elles limitent les applications dans les études sur le terrain qui exigent des comparaisons multiples et rapides parmi des génotypes ou parmi des plantes soumises à des environnements contrastés.

Récemment, des méthodes employant la fluorescence chlorophyllienne ont été développées pour évaluer les propriétés absorbantes des feuilles dans l'UV. Le rapport entre la fluorescence chlorophyllienne induite par un rayonnement UV et par rayonnement visible est lié à la transmittance de l'épiderme dans la région UV (Bilger *et al.* 1997 ; Barnes *et al.* 2000 ; Burchard *et al.* 2000 ; Markstädter *et al.* 2001 ; Cerovic *et al.* 2002 ; Krause *et al.* 2003a).

Une pince à feuille portable (Dual^{ex}®, Dual Excitation, prototype, CNRS-LURE, France, fluorimètre à double excitation) est utilisée pour évaluer de façon non destructive les composés phénoliques présents dans l'épiderme de la feuille (Goulas *et al.* 2004 ; Cartelat *et al.* 2005), (**Annexe B**).

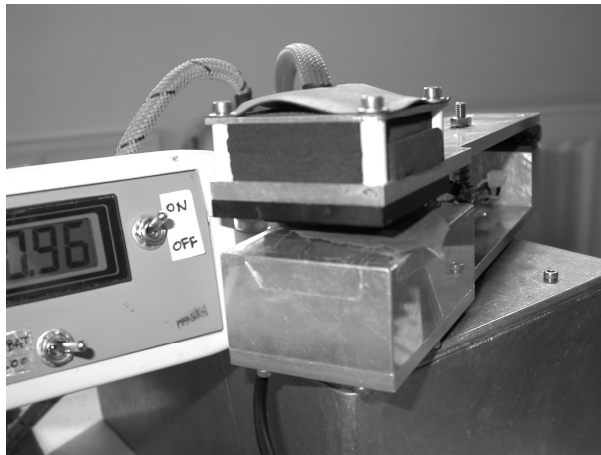


Figure 3-6 : Photographie de la pince à feuille portable (Dual^{ex}®, Dual Excitation, prototype, CNRS-LURE, France, fluorimètre à double excitation).

La mesure de l'absorbance épidermique de la feuille à la lumière UV est basée sur l'effet écran de l'épiderme qui absorbe une partie de la lumière UV incidente et donc diminue la quantité de lumière disponible pour l'excitation de la fluorescence chlorophyllienne. Une lumière rouge incidente est employée comme référence puisque l'épiderme de la feuille est presque transparent dans cette région spectrale. La feuille est alternativement illuminée par deux diodes, l'une dans l'UV (375 nm) et l'autre dans le rouge (655 nm) à une fréquence de modulation de 1 kilohertz. La transmittance de l'épiderme dans l'UV est calculée par le rapport entre les intensités des diodes quand ces deux sources lumineuses sont menées à la même intensité de fluorescence chlorophyllienne. Ainsi, l'absorbance de la feuille aux rayonnements UV peut facilement être définie. Cette méthode non invasive a le grand avantage d'estimer la pénétration des UV sans perturber les propriétés optiques des feuilles. Mais, le Dual^{ex}® est lui même spécifique des composés présents dans l'épiderme et absorbant les UVA (315-380 nm).

Sur un sous échantillon de feuilles, une comparaison est établie entre les valeurs d'absorbance fournies par le Dual^{ex}® et celles obtenues sur un extrait méthanolique (sur les mêmes feuilles). Une très bonne corrélation entre ces deux mesures a été observée.

Cependant le Dualex® nécessite au préalable une calibration pour chaque espèce (**Annexe B**).

- *Le résidu pariétal et ses constituants*

Les lignines et les sucres structuraux (TSC : cellulose, hémicellulose) sont les constituants du résidu pariétal. Le résidu pariétal est une structure coûteuse et peut représenter jusqu'à 50 % de la biomasse. Le résidu pariétal est obtenu par extractions successives de la matière végétale (méthanol, chloroforme puis hydrolyse acide). La part des lignines et des sucres structuraux est déterminée classiquement (à partir de leur teneur en carbone respective et la teneur en carbone du résidu pariétal, Poorter and Villar 1997) et par une nouvelle méthode développée dans le cadre de ce travail, basée sur la chaleur de combustion. La comparaison de ces deux méthodes est présentée en **Annexe E**.

- *Les autres constituants*

Les sucres non structuraux et les acides organiques sont des composés peu coûteux, leur concentration n'a pas été déterminée. Les lipides sont extraits du matériel végétal avec une solution de chloroforme puis déterminés par gravimétrie après évaporation du solvant (**Annexe F**).

3.4. Variabilité de la composition biochimique et du CC des tissus végétaux

- *Les facteurs biologiques*

Les différences de coût de construction les plus évidentes sont observées entre les différents organes de la plante, du fait de leurs grandes différences de composition biochimique. En moyenne le coût d'une feuille est de 1,5 g glucose g⁻¹, les tiges sont un peu moins coûteuses avec 1,45 g glucose g⁻¹ et les racines encore moins avec 1,33 g glucose g⁻¹ (Poorter and Villar 1997). Le coût élevé des feuilles s'explique par leur forte teneur en protéines et par leur faible teneur en minéraux (Poorter and Bergkotte 1992 ; Griffin *et al.* 1993). Il existe une corrélation positive entre les concentrations en protéines et en acides organiques. Cette corrélation est expliquée par le fait que tout les NO₃⁻ transportés aux feuilles y sont réduits. Comme la réduction des nitrates nécessite des acides organiques pour accepter leur charge,

une partie de ces acides est stockée dans les vacuoles des feuilles (Dijkshoorn *et al.* 1968 in Poorter and Villar 1997). Malgré une forte concentration en lignines, les tiges des espèces ligneuses ne présentent pas de coût particulièrement élevé, car les lignines sont accompagnées d'une augmentation de la concentration en TNC (cellulose) peu coûteux. La mycorrhization des racines fibreuses du *Citronne volkameriana* entraîne une augmentation de la concentration en lipides se traduisant par un coût plus élevé de 8 % par rapport aux racines non infectées (Peng *et al.* 1993, in Poorter and Villar 1997). Le plus souvent, les différences de composition entre les tiges et les racines sont petites, comparées à celles des feuilles. Les graines et la chair des fruits sont des organes très coûteux à produire, ils sont caractérisés par des concentrations élevées en TNC et en lipides, et de faibles concentrations en minéraux (Penning de Vries 1983). Contrairement à la chair de fruit, les graines peuvent présenter des concentrations élevées en protéines. La variation de la composition chimique des pièces reproductrices des plantes est beaucoup plus grande que celle des organes végétatifs. Ceci reflète la fonction de ces pièces à accumuler des composés de stockage de divers types, ou pour attirer différents animaux dispersants les graines (Jordano 1995).

Les différences de coût de construction entre les différents groupes fonctionnels sont plus petites qu'entre les différents organes mais les résultats sont assez contrastés. En moyenne le coût de construction des feuilles des espèces ligneuses est supérieur à celui des herbacées (1,54 contre 1,45, Poorter and Villar 1997). Comparées aux feuilles des espèces herbacées, les feuilles des espèces ligneuses contiennent moins de protéines, moins de minéraux, et moins d'acides organiques, des quantités semblables en lipides, sucres, et (hémi)celluloses, mais des concentrations plus élevées en lignines et de composés phénoliques solubles. La composition biochimique des tiges des espèces ligneuses est semblable à celle des espèces herbacées, à l'exception des TSC qui montrent des concentrations beaucoup plus élevées dans les tiges des plantes ligneuses. Malgré les différences de coût de construction entre les espèces décidues et sempervirentes, il n'y a pas de tendance très claire qui se dégage (Navas *et al.* 2003). Certaines études ont montré que les espèces sempervirentes ont des coûts de construction plus élevés que les espèces caduques (Merino *et al.* 1984 ; Sobrado 1991 ; Eamus and Prichard 1998 ; Villar and Merino 2001). D'autres études ont trouvé l'inverse (Merino *et al.* 1982 ; Chapin III 1989; Williams *et al.* 1989). Les feuilles des plantes caduques ont des concentrations plus élevées en protéines, en minéraux et acides organiques que les feuilles des plantes sempervirentes qui ont des concentrations en composés de défense plus importante (lignines, phénols), les concentrations en lipides sont semblables

(Cornelissen *et al.* 1997 ; Poorter and Villar 1997 ; Reich *et al.* 2003). Aucune différence n'a été observée entre différentes formes de végétation arctiques (Chapin III 1989). Dans ces climats froids ou en altitude, les lipides jouent un rôle important dans le stockage d'énergie expliquant ainsi les fortes valeurs de coût de construction des feuilles chez les espèces de tundra (Villar and Merino 2001).

L'ontogénie influence le coût de construction des feuilles. Le coût de construction des feuilles caduques diminue avec l'âge (Merino *et al.* 1984), en revanche les espèces sempervirentes ne montrent aucune variation (Chapin III 1989 ; Kull and Tulva 2002). Le jeune matériel végétal a des concentrations élevées en protéines (liées à la photosynthèse) tandis que les tissus plus anciens ont subi le dépôt des parois cellulaires secondaires et montrent des concentrations plus élevées en lignines, en (hemi)celluloses et en minéraux (Merino *et al.* 1984 ; Gary *et al.* 1998b). Toutefois, l'augmentation parallèle de composés coûteux (protéines) et non coûteux (minéraux) chez les jeunes tissus limite la dérive ontogénique du coût de construction. Par exemple, au sein des espèces herbacées à croissance rapide ou à croissance lente il n'y a pas de différences systématiques de coût de construction même si la composition biochimique varie (Poorter and Bergkotte 1992 ; Cornelissen *et al.* 1997 ; Reich *et al.* 1998). Les premières ont des quantités plus grandes de jeunes tissus par rapport aux deuxièmes. De même, les cellules de petite taille des espèces à croissance lente ont une surface élevée de cellules par rapport au volume des cellules et ont des proportions relativement élevées de composés pariétaux. La plupart du temps, l'ontogénie explique la corrélation négative entre les protéines et les celluloses et lignines (Chapin III 1989). Au niveau de la plante entière les variations ontogéniques de l'allocation de la biomasse entre les différents organes sont toutefois plus importantes que les variations ontogéniques du coût de construction des organes.

L'hypothèse selon laquelle une diminution du coût de construction permet d'augmenter la capacité compétitive des espèces a été proposée par Tilman 1999. Cette hypothèse a été vérifiée chez les espèces invasives qui présentent en général des coûts de construction plus faibles que chez les espèces constitutives des guildes natives (Baruch and Gómez 1996 ; Baruch and Goldstein 1999 ; Nagel and Griffin 2001).

- *Les facteurs environnementaux*

Des feuilles de plantes cultivées à forte disponibilité en azote ont des coûts de construction de 5 à 7% plus élevés que celles issues de milieux pauvres (Lafitte and Loomis 1988 ; Griffin 1994). En milieu nutritif élevé, les plants présentent des concentrations plus élevées en protéines et en minéraux et des concentrations plus faibles en (hémi)cellulose (Waring *et al.* 1985 ; McDonald *et al.* 1986). Par contre, une étude sur le terrain de plusieurs espèces méditerranéennes, montre qu'il n'y a pas de différence systématique de coût de construction entre les feuilles d'individus issus d'emplacements riches ou pauvres (Merino 1987). Les racines développées dans un milieu riche en phosphore sont légèrement moins coûteuses que celles développées dans un milieu pauvre en phosphore (Peng *et al.* 1993).

Une augmentation de la concentration en CO₂ ambiante entraîne une diminution du coût de construction des feuilles de 3%, expliquée par une accumulation d'(hémi)cellulose et par une diminution de la teneur en protéines et en minéraux (Griffin *et al.* 1993 ; Poorter *et al.* 1997).

Suite au passage d'un milieu ombragé à un milieu lumineux, la capacité photosynthétique augmente, entraînant une augmentation de la concentration en hydrate de carbone (composés peu coûteux) et en azote pour la fabrication des protéines photosynthétiques (composés coûteux). Ainsi, le coût de construction exprimé par unité de masse reste relativement stable lorsque la lumière augmente. Certaines études ont montré une augmentation de 4% du coût de construction des feuilles avec la lumière, essentiellement due à une diminution de la teneur en minéraux pour les plants de lumière (Poorter and Evans 1998 ; Williams *et al.* 1989). De plus, la mise en lumière entraîne des concentrations élevées en lignines, tandis que les plantes d'ombre accumulent plus de minéraux (Waring *et al.*, 1985; non publié in Poorter et Villar, 1997).

Plus largement, il a été suggéré que les espèces adaptées aux habitats contraignants devaient présenter des CC plus élevés (Penning De Vries *et al.* 1974 ; Amthor 1989). Ce point est particulièrement bien illustré par l'étude de P'yankov *et al.* 2001) où les espèces tolérantes au stress (espèces S de la classification de Grime) étaient celles qui présentaient les CC les plus élevés.

Il n'y a donc pas de conclusion générale à tirer ni sur l'effet des différents groupes fonctionnels de plantes, ni sur les effets des différents facteurs environnementaux sur le coût

de construction. En effet, les résultats des études sont le plus souvent controversés. Les raisons de ces contradictions sont nombreuses.

L'estimation du CC dépend de l'unité dans laquelle il est exprimé : par unité de masse ou par unité de surface (Sobrado 1991). Du fait de la diversité des méthodes d'estimation du CC, la comparaison des résultats issus de la littérature est difficile si ceux-ci n'utilisent pas la même méthode. Les différences de valeurs entre les méthodes peuvent aller jusqu'à 20 %, ce qui n'est pas négligeable aux vues des faibles variations observées entre les différents groupes écologiques et les effets des facteurs environnementaux. Lorsque qu'un facteur est étudié il faut être sûr que les autres paramètres sont constants vu que le CC varie selon de nombreux facteurs écologiques. Les incidences des facteurs biologiques et environnementaux sur la composition biochimique sont particulièrement grandes pour les protéines, les lignines, les minéraux, et les TNC. Des corrélations positives entre composés coûteux et composés non coûteux (protéines et minéraux) et des corrélations négatives entre composés coûteux (protéines et lignines, lignines et tannins) expliquent l'insensibilité du coût de construction face à ces facteurs (Chapin III 1989 ; Poorter 1994 ; Poorter and Villar 1997).

Tableau 3-3 : Liste des variables étudiées, chez les espèces tempérées au niveau des feuilles, au niveau de la tige feuillée et variables environnementales.

Variables étudiées	Unité	Nom complet
Au niveau de la feuille		
CC _L	(g glucose g ⁻¹)	Coût de construction des feuilles
RM _L	(g g ⁻¹)	Biomasse relative des feuilles
SLA	(m ² kg ⁻¹)	Surface spécifique des feuilles
PHE	(g g ⁻¹)	Contenu en composés phénoliques
MIN	(g g ⁻¹)	Contenu en minéraux
LIP	(g g ⁻¹)	Contenu en lipides
LIG	(g g ⁻¹)	Contenu en lignines
TNC	(g g ⁻¹)	Contenu en composés non structuraux
PROT	(g g ⁻¹)	Contenu en protéines
Au niveau de la tige feuillée		
CC _P	(g glucose g ⁻¹)	Coût de construction des pétioles
CC _S	(g glucose g ⁻¹)	Coût de construction des axes terminaux
RM _P	(g g ⁻¹)	Biomasse relative des pétioles
RM _S	(g g ⁻¹)	Biomasse relative des axes terminaux
CC _A	(g glucose m ⁻²)	Coût de construction mise en place de la surface assimilatrice
Environnementales		
GSF	%	Facteur global du site

4. VARIABILITE INTERSPECIFIQUE ET PLASTICITE DU COUT ASSOCIE AU DEPLOIEMENT DE LA SURFACE ASSIMILATRICE

4.1. La notion de coût associé au déploiement de la surface assimilatrice

Le bilan carboné d'une plante dépend non seulement de la capacité photosynthétique des feuilles, mais également de leur capacité à intercepter l'énergie lumineuse et des coûts énergiques pour produire et pour maintenir la surface assimilatrice et les organes non photosynthétiques (Givnish 1988 ; Messier *et al.* 1999). Plus le coût du renouvellement de la surface assimilatrice sera faible, plus le temps nécessaire au « remboursement » de cette dépense sera court et donc plus vite les feuilles deviendront une source de carbone qui assureront la croissance et l'entretien de la plante entière (Williams *et al.* 1989 ; Poorter 1994 ; Poorter and Rose 2005), (**Annexe A**).

Le coût associé au déploiement de la surface assimilatrice par unité de surface a été défini comme étant la quantité de glucose par unité de surface nécessaire à la croissance de la tige feuillée de l'année (CC_A). Jusqu'à présent, la plupart des travaux ont considéré le coût de construction des feuilles et leur temps de retour sur investissement en ignorant que les feuilles ne fonctionnent pas par elles-mêmes mais nécessitent des structures pour être maintenues afin d'intercepter la lumière (Poorter 1994).

Équation 4-1 : Calcul du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice

$$CC_A = \frac{CC_L \times RM_L + CC_S \times RM_S + CC_P \times RM_P}{SLA \times RM_L}$$

CC_A : coût associé au déploiement de la surface assimilatrice (g glucose m^{-2})

CC_L ; CC_S ; CC_P : coût de construction des feuilles, axes et pétioles (ou rachis) qui constituent la tige feuillée annuelle (g glucose g^{-1})

RM_L ; RM_S ; RM_P : biomasse relative des feuilles, axes et pétioles (ou rachis) par rapport à la biomasse de la tige feuillée annuelle (g g^{-1})

D'après l'équation, le coût de construction associé au déploiement de la surface assimilatrice dépend de facteurs morphologiques (contribution relative de chaque organe à la biomasse de la tige feuillée, surface spécifique des feuilles) et de facteurs biochimiques (coût de construction des feuilles et des structures porteuses: tiges annuelles et pétioles) qui dépendent de la composition biochimique de ces organes. Le CC_A de la tige feuillée ajoute donc une composante énergétique au coût en matière sèche pour déployer la surface foliaire proposée par (Pickup *et al.* 2005).

En supposant que l'assimilation photosynthétique du carbone est liée à la surface de feuille, le coût de construction de la tige feuillée de l'année exprimé par unité de surface (CC_A) est une estimation du rapport entre le coût carboné et le gain carboné. Ce rapport coût/bénéfice est un trait qui pourrait être lié à la tolérance à l'ombrage. Sous un climat lumineux donné, il est un indicateur du temps requis pour que la tige feuillée de l'année rembourse son propre coût et devienne une source de carbone à part entière pour les autres organes de la tige feuillée. (Williams *et al.* 1989 ; Poorter *et al.* 2006).

La réduction de ce coût, soit au travers de la composition biochimique des organes, soit au travers d'une augmentation de SLA, permettrait de réduire le temps de retour sur investissement de la tige feuillée, et d'augmenter le gain de carbone, et plus généralement, la vigueur de la plante. Par exemple, la vigueur des espèces invasives par rapport aux espèces indigènes a pu être associée à un coût de construction de la feuille inférieur et à un SLA élevé (Nagel and Griffin 2001 ; Baruch and Goldstein 1999 ; Nagel *et al.* 2002).

4.2. Les différences interspécifiques de mise en place de la surface assimilatrice

Les différences interspécifiques de mise en place de la surface assimilatrice ont été étudiées sur neuf espèces ligneuses des forêts tempérées et trois espèces tropicales plus ou moins tolérantes à l'ombrage, toutes au stade de semis. Ces plants ont été prélevés en sous bois correspondant à un rayonnement théorique relatif (Facteur Global du Site, GSF) compris entre 10 % et 20 %. Des effets ontogéniques (Niinemets 2006) ne peuvent pas être entièrement exclus de notre étude du fait de notre plan d'échantillonnage, même si nous avons pris soin de prélever des échantillons de tailles similaires.

- *Les différences interspécifiques de coût de construction des feuilles*

La Figure 4-1 représente la gamme de variabilité interspécifique du coût de construction des feuilles (g glucose g^{-1}) des espèces tempérées et tropicales étudiées (**Annexe A, Annexe B, Annexe C et Annexe E**).

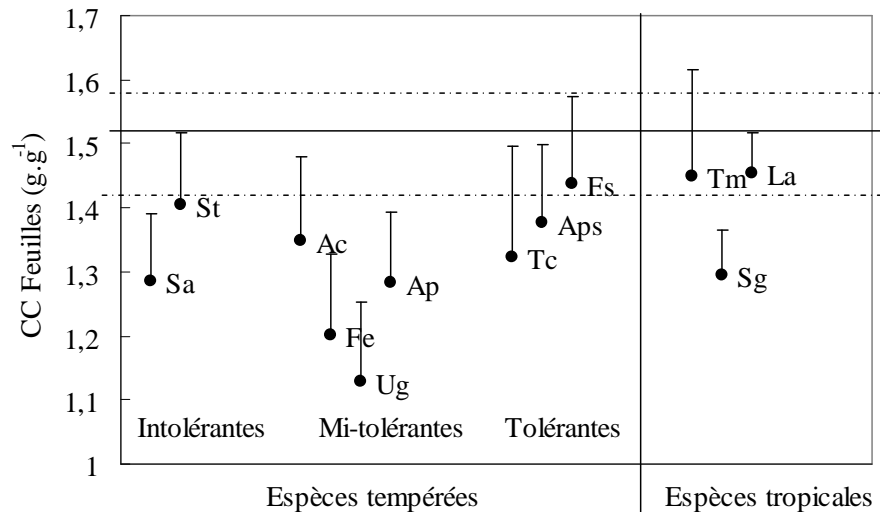


Figure 4-1 : Coût de construction ($\text{g de glucose requis par g de biomasse formée}$) pour 12 espèces ligneuses feuillues (9 tempérées décidues et 3 tropicales). Le point représente la moyenne. Le nombre total d'observation est le suivant : pour les espèces tempérées : *A. pseudoplatanus L.* n = 14; *F. sylvatica L.* n = 21; *S. torminalis L.* n = 9; *S. aria L.* n = 19; *A. campestre L.* n = 19; *A. platanoïdes L.* n = 24; *U. glabra.* n = 9; *F. excelsior L.* n = 21; *T. cordata.* n = 17 et pour les espèces tropicales : *Licania alba* n = 24; *Symphonia globulifera* n = 23; *Tachigali melinonii* n = 30. Les espèces tempérées sont classées par groupe de tolérance à l'ombrage. La barre verticale représente la différence entre le CC calculé en supposant une nutrition azotée exclusivement ammoniacale (valeur minimale) et le CC calculé en supposant une nutrition nitrique (coût maximal). L'écart type entre les différents plants étant négligeable par rapport au surcoût d'une nutrition nitrique, il n'est pas représenté. La ligne horizontale continue représente la médiane. Les lignes en pointillés représentent les quartiles 25% et 75% des valeurs de coût de construction obtenues sur 203 espèces ligneuses de différents écosystèmes (tempéré, tropicale, boréal) estimées par différentes méthodes en supposant une nutrition nitrique (Poorter and Villar 1997).

Il y a des différences de coût de construction entre les feuilles des différentes espèces étudiées. Dans certains cas, les valeurs de coût sont inférieures à $1,13$ (*U. glabra*) dans d'autres cas, elles sont supérieures à $1,4$ g glucose g^{-1} (*F. sylvatica*). Les différences trouvées ici varient d'un facteur 0,3 soit 25%. Les différences de coût sont également importantes pour les espèces tropicales ($1,45$ pour le *L. alba* et $1,29$ pour le *S. globulifera*). Cette variabilité est susceptible de jouer un rôle important au niveau de la balance carbonée de la plante,

puisque'une espèce peut dépenser 25% de carbone en plus pour la croissance des feuilles (soit pour une activité métabolique plus élevée, soit pour un investissement plus important dans les mécanismes de protection contre les herbivores ou les pathogènes).

Même en considérant le surcoût résultant d'une réduction des nitrates dans les organes non photosynthétiques (représenté par la barre d'erreur), les valeurs observées sont inférieures à celles observées par Poorter and Villar (1997). Ceci peut être du à l'étendue des espèces regroupées dans la synthèse de Poorter qui concerne des espèces issues d'une large gamme d'environnement (espèces boréales, méditerranéennes, tempérées et tropicales), caduques et sempervirentes, feuillues et conifères. Notre étude ne concerne que 9 espèces tempérées caduques et 3 espèces tropicales. De plus, notre travail porte sur des individus récoltés en sous bois, ce qui pourrait suggérer une certaine placidité du CC, dont les valeurs à l'ombre seraient plus faibles qu'en pleine lumière (Williams *et al.* 1989).

Des variations interspécifiques du CC des feuilles avaient déjà été rapportées (Griffin 1994 ; Villar and Merino 2001). Souvent, ces différences ont été soulignées entre différents groupes fonctionnels d'espèces comme des espèces herbacées par rapport à des arbres, des feuilles caduques par rapport à des feuilles persistantes, des angiospermes par rapport à des gymnospermes (Poorter 1994 ; Merino 1987 ; Poorter and Villar 1997 ; Eamus *et al.* 1999 ; Villar and Merino 2001 ; Navas *et al.* 2003). Le CC des feuilles diffère également entre des plants de stratégie écologique différente (P'yankov *et al.* 2001) ou encore entre des espèces indigènes et des espèces envahissantes (Baruch and Goldstein 1999).

Ici, nous observons de grandes variations du coût de construction des feuilles chez des semis d'arbre à feuilles caduques partageant le même environnement. Ces différences de coût de construction peuvent avoir des conséquences sur le bilan carboné de jeunes plants sous couvert.

Il a été montré que le coût de construction des feuilles d'espèces du genre *Piper* était plus élevé chez les espèces héliophiles (qui participent au premier stade de succession) que chez les espèces sciaphiles (qui arrivent plus tardivement dans la succession, Williams *et al.* 1989). Ceci diffère de nos résultats car, bien que les différences entre nos 9 espèces tempérées soient plus prononcées que celles obtenues entre les espèces de *Piper*, nous n'observons pas de relation entre le coût de construction des feuilles et le tempérament des espèces par rapport à la lumière. De fortes valeurs de coût de construction peuvent être observées chez des espèces tolérantes (*F.sylvatica*) comme chez des espèces intolérantes (*S. aria*), tandis que les coûts les plus faibles sont trouvés chez les espèces mi-tolérantes (*F. excelsior* et *U. glabra*).

Cependant, la grande variabilité du CC des feuilles suggère une grande variation de la composition biochimique dans les feuilles de ces jeunes arbres.

- *Les différences interspécifiques de composition biochimique des feuilles*

La Figure 4-2 représente la gamme de variabilité interspécifique de la composition biochimique des feuilles (mg g^{-1}) des espèces tempérées étudiées sur le site du Graoully (**Annexe A et Annexe C**).

4. Variabilité Interspécifique et Plasticité

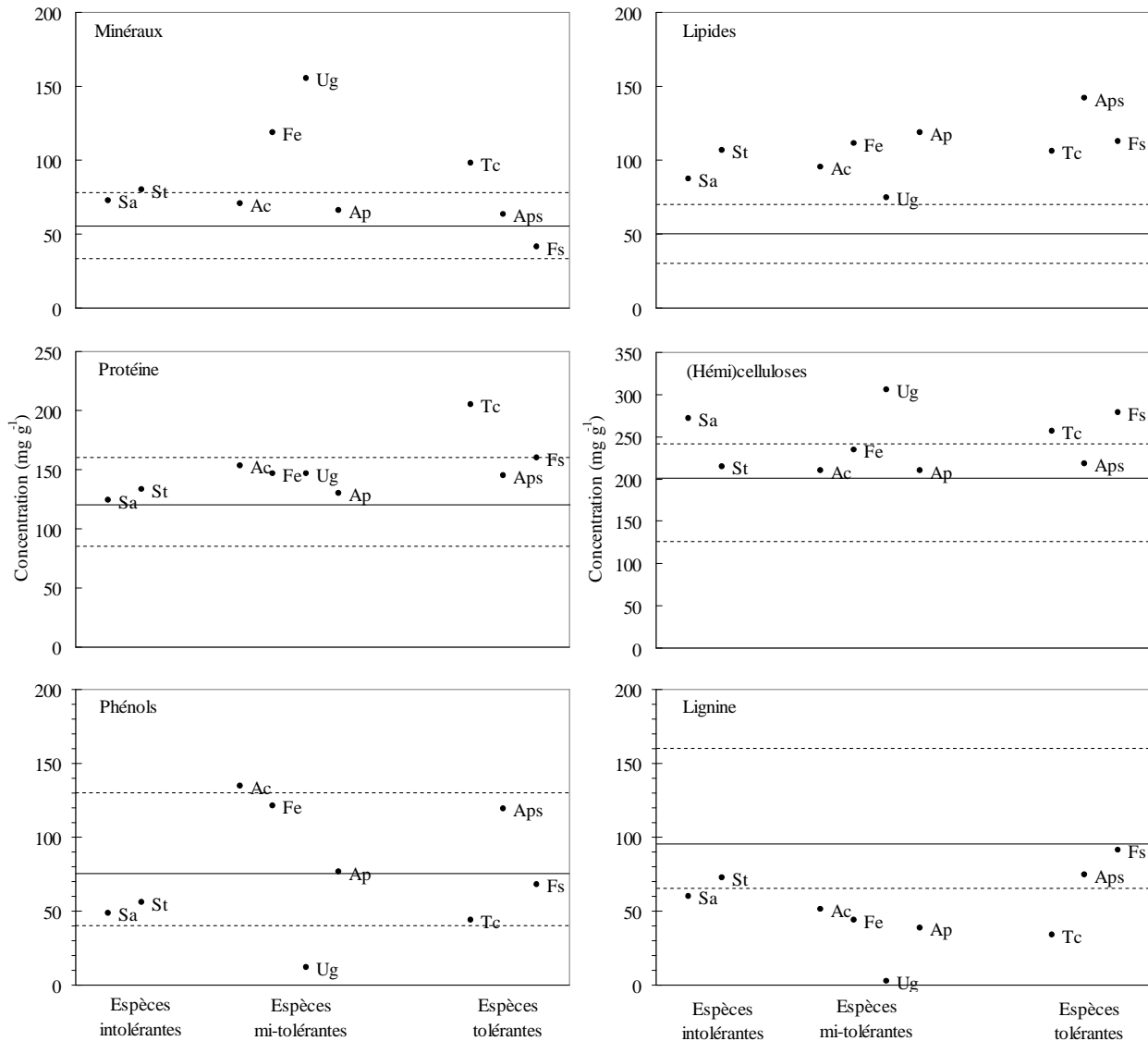


Figure 4-2 : Caractérisation de la composition biochimique des feuilles de 9 espèces tempérées feuillues. Les points représentent les moyennes. Concentration en minéraux, lipides, protéines, (hémi)celluloses, phénols et lignine (mg g⁻¹). Suivant les espèces et les composés mesurés, le nombre total d'observation varie entre les valeurs suivantes : *A. pseudoplatanus L.* : n= 16-21; *F. sylvatica L.* :7-21; *S. torminalis L.* n= 5-9; *S. aria L.* n= 7-19; *A. campestre L.* n= 7-19; *A. platanoides L.* n= 10-24; *U. glabra* n=:5- 9; *F. excelsior L.* n= 7-21; *T. cordata.* n= 7-17. Les espèces sont classées par groupe de tolérance à l'ombrage. La ligne horizontale continue représente la médiane. Les lignes en pointillés représentent les quartiles 25% et 75% des valeurs de coût de construction obtenues sur 203 espèces ligneuses issues de différents écosystèmes (tempéré, tropicale, boréal) estimées par différentes méthodes (Poorter and Villar 1997). Nous n'avons pas réalisé l'analyse biochimique sur les espèces tropicales.

La composition biochimique des feuilles des neuf espèces étudiées est dans la gamme des valeurs rapportées pour des feuilles des espèces ligneuses de différents écosystèmes (Poorter and Villar 1997). Toutefois les espèces étudiées ici ont un contenu en lipides plus élevé que les valeurs issues de la compilation de Poorter, et un contenu en lignines inférieures. Nous observons de grandes variations de la composition biochimique des feuilles des semis d'arbre à feuilles caduques partageant le même environnement. Ces différences de composition biochimiques permettent dans certains cas d'expliquer les valeurs hautes ou basses du CC des feuilles. Par exemple, les feuilles de *U. glabra* présentent un faible CC, qui s'explique bien par une plus grande richesse en minéraux (cendre) et en cellulose que les autres espèces et de moindres concentrations en lipides, en composés phénoliques solubles et en lignine. Les feuilles contiennent donc plus de constituants peu coûteux et moins de composés coûteux par rapport aux autres espèces. Les coûts élevés des feuilles de *F. sylvatica* et d'*A. pseudoplatanus* sont liés à de fortes teneurs en lignines et en lipides. Les autres espèces montrent souvent une concentration élevée dans l'un des composés coûteux (lignines, lipides, composés phénoliques ou protéines) en même temps qu'une concentration élevée dans un des constituant peu coûteux (minéraux, TSC, TNC ou acides organiques, les deux derniers n'ayant pas été déterminés ici), ou encore un équilibre entre deux constituants coûteux ou deux constituants peu coûteux (Chapin III 1989 ; Poorter and Bergkotte 1992). C'est par exemple le cas pour *T. cordata* qui contient beaucoup de protéines mais peu de lignines et peu de composés phénoliques, pour *F. excelsior* qui contient beaucoup de cendres et de composés phénoliques, ou encore pour *F. sylvatica* de qui contient beaucoup de cellulose mais peu de cendres.

La différence de CC des feuilles entre les arbres des espèces ligneuses à feuilles caduques, semi caduques et sempervirents a pu être expliquée par leur contenu de lipide (Villar and Merino 2001). La concentration en lipides doit être l'un des facteurs déterminant responsable de la variation du CC associé à la durée de vie des feuilles et du type d'écosystème. Le manque de variation interspécifique du CC des feuilles dans des études précédentes était souvent lié à des corrélations positives entre des composés à haut et faible coût (protéines et minéraux par exemple), (Chapin III 1989 ; Poorter 1994 ; Poorter and Villar 1997), ou encore à des corrélations négatives entre composés coûteux comme les protéines et la lignine et les tannins (Chapin III 1989) ; les protéines et les cires. Mais dans notre étude, nous observons des corrélations négatives entre la lignine et les minéraux ($r = -0,85$) et entre la cellulose et les composés phénoliques ($r = -0,75$) qui pourrait expliquer les différences interspécifiques

de CC des feuilles. En effet, les facteurs principaux expliquant les variations interspécifiques du CC des feuilles sont les quantités de minéraux et de lignines (**Annexe C**).

Nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) afin de rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre les différentes variables étudiées. Afin de juger de la contribution de chaque famille de composés à la variabilité interspécifique des coûts de construction des feuilles.

L'ACP a permis de faire ressortir deux axes : l'axe 1 en abscisse explique 34 % de la variance des différentes espèces tempérées. Cette variance est fortement influencée par le contenu en lignine (positivement) et le contenu en minéraux (négativement). Le second axe, en ordonnée explique 23% de la variance des différentes espèces tempérées. Cette variance est fortement influencée par le contenu en protéines, en cellulose et le SLA (positivement) et par le contenu en phénols et lipides (négativement).

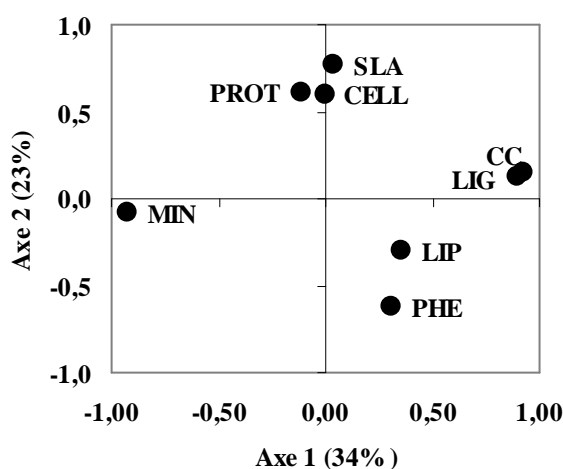


Figure 4-3 : Analyse en composantes principales des variables de la composition biochimique et du coût de construction des feuilles par groupe d'espèces. Le carré des corrélations présente la structuration des variables mesurées et leur corrélation avec les axes principaux : SLA : surface spécifique des feuilles, CC : coût de construction des feuilles, PROT : contenu en protéines, CELL : contenu en (hémi)cellulose, LIG : contenu en lignines, MIN : contenu en minéraux, LIP : contenu en lipides, PHE : contenu en composés phénoliques. L'axe 1 en abscisse explique 34 % de la variance des différentes espèces tempérées. L'axe 2 en ordonnée explique 23% de la variance des différentes espèces tempérées.

En positionnant les différents plants selon ces deux axes, il apparaît que les variables choisies permettent de bien séparer les différentes espèces (elles se positionnent sous forme d'agrégats). En revanche, en positionnant les groupes de tempérament (intolérantes, intermédiaires et tolérantes, il s'avère que les variables choisies n'expliquent plus le tempérament des espèces (les groupes de tolérance sont éparpillés sur le graphique).

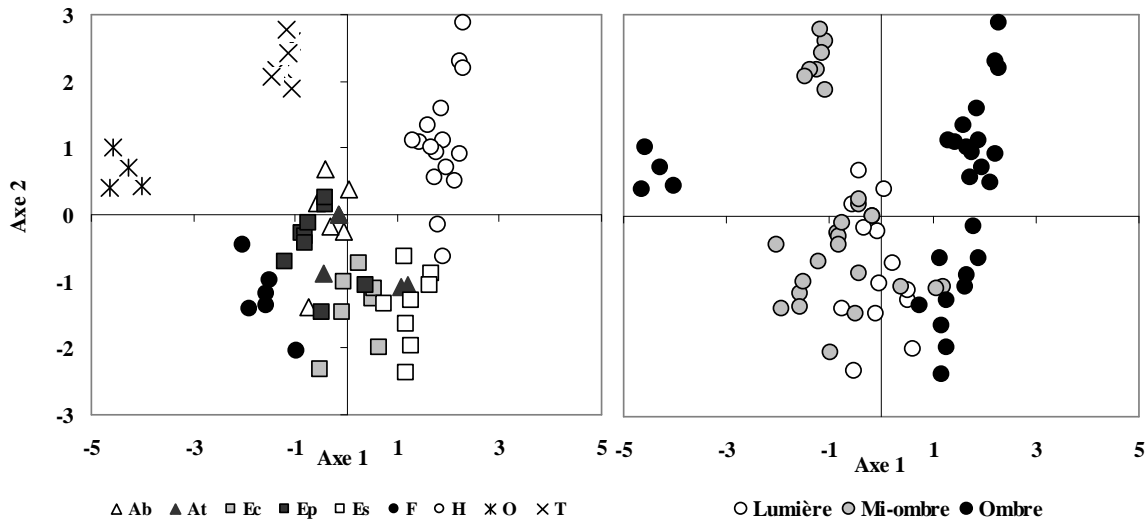


Figure 4-4 : Analyse en composante principale, l'axe 1 représente les variance expliquée majoritairement par le contenu en lignine (dans le sens positif) et le contenu en minéraux (dans le sens négatif). L'axe 2 représente la variance expliquée majoritairement par le contenu en protéines, en cellulose et le SLA (dans le sens positif) et le contenu en phénols et en lipides (dans le sens négatif). Le graphe de gauche présente la répartition des plants des différentes espèces tempérées dans le plan défini par les variables mesurées : alisier blanc (triangles blanc, n = 7), alisier torminal (triangles noirs, n = 4), érable champêtre (carrés gris, n = 7), érable sycomore (carrés blancs, n = 8), érable plane carrés noirs, n = 9), frêne (ronds noirs, n = 6), hêtre (ronds blancs, n = 16), orme (étoile, n = 4), tilleul (croix, n = 7). Le graphe de gauche présente la répartition des groupes de tolérance à l'ombrage dans le plan défini par les variables mesurées : les espèces de lumière (rond blanc, n = 14), les espèces de mi-ombre (ronds gris, n = 26) et les espèces d'ombre (ronds noirs, n = 28).

Cependant, l'analyse de la composition biochimique des feuilles de plants croissant en régénération naturelle en forêt tempérée ne permet pas de mettre en relation les concentrations des différents composés biochimiques avec le tempérament des espèces.

L'analyse de la composition biochimique des feuilles permet d'expliquer les variations du coût des feuilles. Cependant les grandes différences de compositions biochimiques entre les feuilles des différentes espèces ne sont pas reflétées dans leur totalité par le CC des feuilles.

Le CC se révèle moins différent entre les différentes espèces, même si la composition biochimique de l'organe est différente, du fait de compensations qui existent en termes de coût énergétique entre les différents composés.

- ***Les différences interspécifiques de coût de construction des autres organes***

Les tiges sont en moyenne plus coûteuses que des feuilles, contrairement à ce qui a été rapporté (Poorter *et al.* 1997). Cette différence disparaît néanmoins si, comme Poorter, nous incluons le coût énergétique de la réduction des nitrates dans les organes non photosynthétiques. Ce coût de construction élevé pour les tiges est dû à de fortes teneurs en lignines. Le coût de construction des pétioles est inférieur à celui des feuilles, ceci a déjà été rendu compte dans de nombreuses espèces (Niinemets 1998; **Annexe A**). Quoiqu'il en soit, les espèces qui ont un coût de construction des feuilles important montrent également un coût de construction des tiges et des pétioles élevé (*F. sylvatica*). Ce n'est pas en accord avec l'hypothèse que les espèces qui ont le moins de support mécanique (moins de lignine) dans leurs brindilles exigent plus d'appui dans les feuilles (plus de lignine, Pickup *et al.* 2005, **Annexe A et Annexe C**).

- ***La surface spécifique des feuilles***

De grandes différences de surfaces spécifiques des feuilles (SLA) et d'allocation de biomasse au sein de la tige feuillée sont observées entre les différentes espèces (**Annexe C**). Les feuilles représentent la majeure partie de la biomasse de la tige feuillée (entre 69% chez *F. excelsior* et 84% chez *F. sylvatica*). Les axes terminaux et les pétioles représentent chacun en moyenne 14 et 10 % de la biomasse respectivement (**Annexe A et Annexe C**)

Le SLA est un trait connu pour contrôler la croissance des plantes (Reich *et al.* 1998 ; Poorter and Werger 1999 ; Wright *et al.* 2004) à travers des processus basés sur la surface (assimilation photosynthétique, interception de lumière). Il y a des différences de SLA entre les feuilles des différentes espèces tempérées étudiées. Dans certains cas, les valeurs de SLA sont inférieures à $30 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*S. aria*) dans d'autres cas, elles sont supérieures à $40 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*T. cordata*). Les valeurs de SLA variaient de 40% (**Annexe C, fig 3b**). Deux des trois espèces tolérantes à l'ombre (*F. sylvatica* et *T. cordata*) montrent des valeurs élevées de SLA mais *A. pseudoplatanus* a des valeurs faibles de SLA, semblables à celles des espèces intolérantes.

Ceci n'est pas en accord avec l'hypothèse que la forte concurrence pour la lumière favoriserait les espèces à fort SLA (Givnish 1988 ; Niinemets and Kull 1998 ; Poorter and Werger 1999). Nous n'observons pas de corrélation entre SLA et la teneur en tissus pariétaux (lignines et hémicelluloses), donc les différences de SLA ne sont donc probablement pas dues à des différences de densité des feuilles. Les valeurs de SLA des feuilles des trois espèces tropicales étudiées varient d'un facteur 3,7, les plus faibles valeurs étant celles du *Licania alba* ($65 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), les plus élevées étant celles du *Takigiali melinonii* ($240 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$).

- ***Les différences interspécifiques de coût au niveau de la tige feuillée***

(Annexe A et Annexe C)

La quantité de glucose exigée pour déployer 1 m^2 de surface de feuilles varie entre 41 pour *U.glabra* et 69 g m^{-2} pour *S.torminalis*. Pour des espèces feuillues partageant un même milieu, nous observons de grandes différences interspécifiques de CC_A (elles diffèrent d'un facteur 1,7). Néanmoins ces différences ne reflètent pas le tempérament des différentes espèces. Aux vus de l'Équation 4-1, les différences interspécifiques de CC_A peuvent être attribuées à des modifications morphologiques (différences de SLA ou de répartition de biomasse des tiges, des pétioles et des limbes de feuille au sein de la tige feuillée) et/ou à des modifications biochimiques (différences de coût de construction des différents organes). Il n'y a aucune corrélation entre le CC des feuilles et le CC_A de la tige feuillée en dépit de la grande variabilité interspécifique du CC des feuilles et malgré le fait que les feuilles représentent plus de 70% de la biomasse de la tige feuillée. Les variations interspécifiques du CC_A sont expliquées par la variation de SLA, ceci confirmant que les variations énergétiques nécessaires au déploiement de la surface assimilatrice sont contrôlées essentiellement par la morphologie de la feuille. Le SLA est donc plus important que le CC des organes de la tige feuillée dans la balance carbonée de la plante (Villar and Merino 2001 ; Nagel *et al.* 2002 ; Wright *et al.* 2004).

De fortes teneurs en minéraux peuvent expliquer de faibles valeurs dans les CC des feuilles de tomate (Gary *et al.* 1998a) et la variation du contenu en lignine explique la variation du CC des aiguilles de jeunes *Picea abies* (Niinemets 1997).

4.3. La plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice

- *Définition de la plasticité*

La plasticité phénotypique (sensus largo) correspond à la variabilité intra spécifique du caractère étudié. A l'intérieur d'une même espèce, le phénotype n'est pas constant. Cette variation phénotypique peut être le reflet de l'existence de plusieurs génotypes (existence d'un polymorphisme pour ce caractère au sein de l'espèce) ou de la variabilité du phénotype que peut présenter un même génotype placé dans des environnements différents suite à une acclimatation (plasticité phénotypique sensus stricto). Dans notre étude, nous n'avons pas vérifié l'appartenance au même génotype de tous les plants étudiés, donc nous parlerons donc de plasticité phénotypique sensus largo.

La plasticité de la mise en place de la surface assimilatrice a été étudiée sur quatre espèces ligneuses au stade semis, plus ou moins tolérantes à l'ombrage. Deux espèces tolérantes (*A. pseudoplatanus* et *F. sylvatica*) et deux espèces hémitolérantes (*A. platanoides* et *F. excelsior*) ont été prélevés dans le même gradient de lumière variant de 6 % à 52 % du GSF. Malheureusement, des valeurs intermédiaires de GSF (20-40%) ont été sous représentées pour les quatre espèces.

- *La plasticité du coût de construction des feuilles*

La Figure 4-5 représente la gamme de variabilité interspécifique du coût de construction des feuilles (g glucose.g⁻¹) des espèces tempérées étudiées (**Annexe A, Annexe C et Annexe E**).

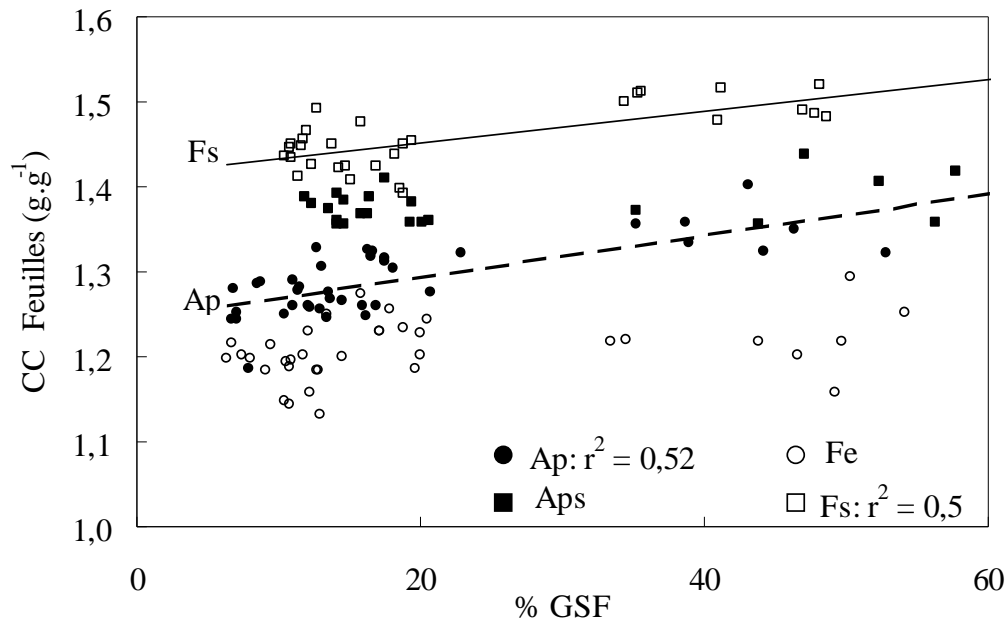


Figure 4-5 : Relation entre le climat lumineux (Facteur Global du Site, GSF) et le coût de construction des feuilles (g g^{-1}) pour *A. platanoides* (ronds noirs, $n = 40$), *A. pseudoplatanus* (carrés noirs, $n = 25$), *F. excelsior* (ronds blancs, $n = 36$) et *F. sylvatica* (carrés blancs, $n = 30$). Les coefficients de détermination (r^2) et les régressions linéaires ne sont représentés que lorsque l'effet de la lumière est significatif ($p < 0,05$).

Seuls les coûts de construction des feuilles de *F. sylvatica*. et *A. platanoides* augmentent avec le climat lumineux. Alors que chez ces deux espèces, une augmentation de 10 % à 52 % du GSF entraîne une augmentation de 5% du coût de construction des feuilles, elle n'entraîne aucune variation chez *F. excelsior* et *A.pseudoplatanus*. Le coût de construction des feuilles de *F. sylvatica* et *A. platanoides* est plus plastique que celui des deux autres espèces. Nos résultats sont donc en accord avec les informations trouvées dans la littérature : les variations du CC des feuilles avec le climat lumineux, quand elles existent restent modestes (quelques %). (Poorter *et al.* 2006).

Les feuilles peuvent être parfois de 10 à 20 % plus coûteuses dans les habitats ouverts par rapport au sous bois pour certaines espèces tropicales du genre *Piper* (Williams *et al.* 1989). Nous n'avons pas réussi à obtenir un gradient suffisant de lumière pour étudier l'effet de la lumière sur le coût de construction des espèces tropicales. Surtout les valeurs de GSF obtenues par les photographies hémisphériques ne sont pas fiables en forêt tropicale du fait

des différents étages de la strate arborée. Sims and Pearcy (1991) ont étudié le rôle de la lumière disponible en examinant le CC d'*Alocasia macrorrhiza* en les transférant d'un environnement ombragé à un environnement lumineux. Ils n'ont pas trouvé d'effet de la lumière sur le CC exprimé par unité de masse.

- ***La composition biochimique des feuilles***

La teneur en minéraux des feuilles de trois espèces (les deux érables et *F. excelsior*) diminue légèrement avec le climat lumineux. Pour ces trois espèces, le coût de construction des feuilles est corrélé négativement avec la teneur en minéraux des feuilles. *F. sylvatica* ne montre aucune variation de la teneur en minéraux. Sauf pour *A. platanoides*, la teneur en azote des feuilles (par unité de masse) augmente avec le climat lumineux, permettant ainsi d'augmenter la photosynthèse mais en même temps d'augmenter le CC des feuilles (vu le coût élevé des protéines). Dans cette étude, il y a une corrélation négative entre les concentrations en azote et en cendres pour les deux érables et *F. excelsior*, ce qui montre à nouveau que les feuilles riches en protéines sont également riches en minéraux (Poorter and Bergkotte 1992 ; Poorter and de Jong 1999 ; Villar and Merino 2001). Cette corrélation positive entre un composé coûteux (les protéines) et un composé peu coûteux (les minéraux) limite les variations de CC.

Les composés phénoliques solubles (mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu) augmentent significativement avec l'augmentation du climat lumineux chez *F. excelsior* et *A. platanoides* (les deux autres espèces n'ayant pas été étudiées). Pour un même climat lumineux, les feuilles d'*A. platanoides* contiennent plus de composés phénoliques par unité de surface que celles de *F. excelsior* (**Annexe B**). L'augmentation du climat lumineux entraîne également une augmentation de la synthèse de composés phénoliques épidermiques absorbants dans l'UV (mesurés avec le Dualex®). La capacité de l'épiderme à faire écran aux rayonnements UV a déjà été rapportée (Krause *et al.* 2003b ; Goulas *et al.* 2004).

Nous trouvons une bonne corrélation entre la méthode de Folin et la méthode du Dualex®, cependant les corrélations diffèrent entre les deux espèces du fait des différences de localisation des phénols, des natures différentes et des stades de réduction différents. De plus, nous trouvons une bonne corrélation entre les mesures du Dualex® (AUV) et l'absorbance de

l'extrait phénolique mesuré à 375 nm (A_{375}) et à 305 nm (A_{305}) avec des pentes semblables pour les deux espèces étudiées. Cependant la corrélation est 3 à 4 fois plus importante dans l'UV-B (à 305 nm) que dans l'UV-A (à 375 nm). Ceci est attendu puisque la plupart des composés absorbants dans l'UV ont une absorption beaucoup plus grande dans la région UV-B que dans la région UV-A. Ceci est bien illustré par les spectres d'absorbance des extraits de feuille où les valeurs d'absorbance à 305 nm sont plus hautes que les valeurs d'absorbance à 375 nm. Ce résultat démontre que la technique non invasive de la pince Dualex® fournit une bonne évaluation de la protection de feuille contre le rayonnement solaire d'UV-A (à 375nm). Les variations du contenu en composés phénoliques absorbant dans l'UV avec le climat lumineux sont plus importantes dans les feuilles de *F. excelsior* que dans celles d' *A. platanoides*. Cette accumulation de composés absorbant dans l'UV (dans les cellules épidermiques) est connue pour protéger les cellules du mésophile et l'appareil photosynthétique contre les radiations UV (Mazza *et al.* 2000 ; Kolb *et al.* 2001) auxquels sont soumis les feuilles de milieu ouvert (Krause *et al.* 2003a). Les feuilles de lumière de *F. excelsior* accumulent des composés écran aux UV-B et aux UV-A (acides hydroxycinnamiques, flavones); tandis qu'*A. platanoides* accumule des composés écran aux UV-B uniquement (composés phénoliques simples, acides phénoliques, flavonoïdes). Cependant, la nature exacte des composés phénoliques induits dans la protection des UV n'a pas été identifiée.

Dans notre étude, le faible taux de variation du CC de *F. excelsior* avec le climat lumineux s'explique par la corrélation négative entre les composés phénoliques épidermique (Dualex®) et les protéines (azote) qui sont tous deux des composés biochimiques coûteux. Cette corrélation n'existe pas chez *A. platanoides* ce qui pourrait expliquer la plus grande plasticité du CC des feuilles chez cette espèce.

Les autres composés biochimiques (lignines, celluloses, lipides) n'ont pas été déterminés dans le cadre de cette étude mais d'autres études ont montré que la concentration en lignine augmentait et que la concentration en cellulose diminuait lorsque la lumière augmentait (Niinemets and Kull 1998). Cela veut dire que l'investissement de biomasse dans des composés structuraux est relativement constant le long d'un gradient de lumière. Le CC des autres organes de la tige feuillée (pétioles, rachis et axes terminaux) n'est pas affecté par le climat lumineux.

- *La surface spécifique des feuilles et l'allocation de biomasse*

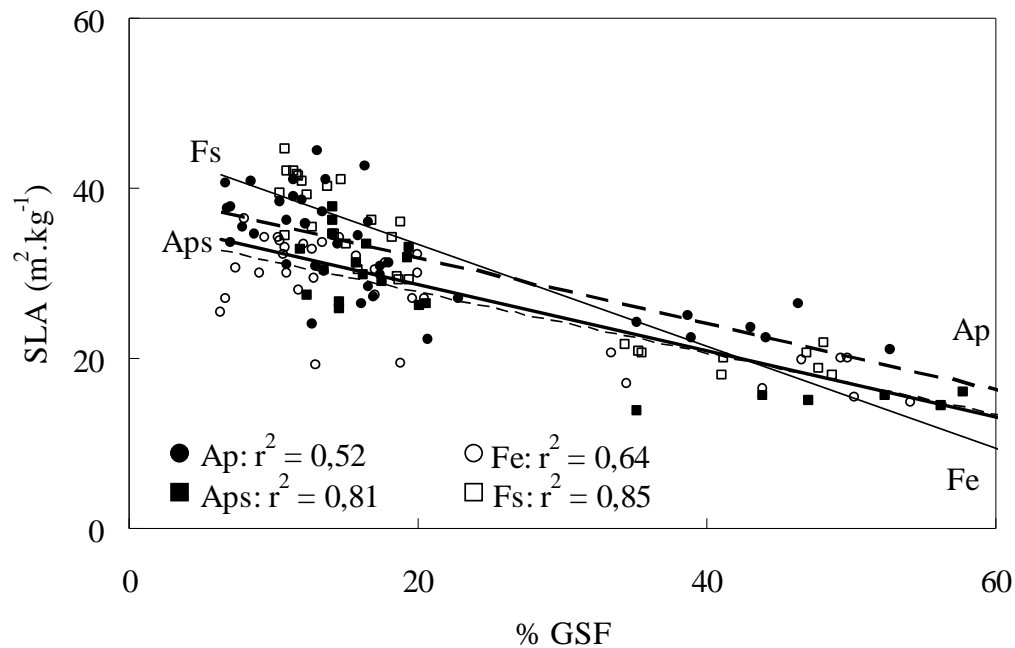


Figure 4-6 : Relation entre le climat lumineux (Facteur Global du Site, GSF) et la surface spécifique des feuilles (m^2kg^{-1}) pour *A. platanoides* (ronds noirs, $n = 40$), *A. pseudoplatanus* (carrés noirs, $n = 25$), *F. excelsior* (ronds blancs, $n = 36$) et *F. sylvatica* (carrés blancs, $n = 30$). Les coefficients de détermination (r^2) et les régressions linéaires ne sont représentés que lorsque l'effet de la lumière est significatif ($p < 0,05$).

Les différences de surface spécifiques observées sont importantes. Au minimum on observe une augmentation de 30% du SLA chez l'*A. platanoides* avec l'ombrage. Chez les deux espèces tolérantes (*A. pseudoplatanus* et *F. sylvatica*) le SLA est multiplié par deux.

De telles différences de SLA ont déjà été rapportées par d'autres auteurs (Chabot *et al.* 1979 ; Niinemets *et al.* 2003). Ici, les espèces tolérantes montrent une plus grande plasticité de SLA avec le climat lumineux que les intolérantes, comme l'a déjà mentionné (Poorter and de Jong 1999 ; Poorter *et al.* 2006). L'augmentation de SLA des feuilles avec l'ombrage est connue pour expliquer le contenu inférieur en azote par unité de surface de feuille. Ceci entraîne une capacité photosynthétique et une respiration exprimées par unité de surface plus faible. Sous faible éclaircissement, l'assimilation nette de CO_2 et le point de compensation sont donc plus

faible ce qui permettrait le maintien d'un bilan carboné positif sous faible éclaircissement (Boardman 1977).

Les corrélations négatives entre le SLA et le CC des feuilles trouvées ici sont en accord avec un plus fort investissement en composés structuraux (avec des lignines au coût élevé et des (hemi)celluloses au coût faible) dans les feuilles de lumière du à un changement de contribution des parenchymes spongieux et palissadiques, ou à une diminution de la taille des cellules avec la lumière, comme l'a suggéré Bazzaz and Wayne (1994).

La plasticité des feuilles observée ici est surtout morphologique, peu biochimique (à l'exception des phénols). Tandis que *F. sylvatica* favorise l'allocation de biomasse vers les feuilles lorsque l'ombrage augmente, les érables favorisent l'allocation de biomasse vers les pétioles. Aucune modification de l'allocation de biomasse n'a été observée chez le frêne. Une augmentation de l'allocation de biomasse vers les feuilles et les pétioles avec l'ombrage a également été observée pour des espèces tempérées et tropicales (King 1991 ; King 2001 ; Poorter 2001). Une forte allocation de biomasse vers les feuilles à l'ombre est une prédisposition à maximiser les gains de C, de même l'augmentation de la proportion de supports mécaniques dans les pétioles augmente avec la lumière.

Ces bouleversements peuvent résulter soit de changements d'ontogénie (plasticité apparente) résultant des différences de taille atteintes par les différents individus poussant dans des milieux différents en lumière (King 2001), ou alors d'une réelle optimisation de l'allocation de biomasse (vraie plasticité) indépendante cette fois de la taille des individus.

Quoiqu'il en soit, les changements de SLA et d'allocation de biomasse de la tige feuillée aux pétioles et aux feuilles entraînent une réduction du coût associé au renouvellement de la tige feuillée. Ainsi, les changements de la structure de la feuille et de l'allocation de biomasse de tissus vers des tissus à faible coût diminuent le coût associé au renouvellement de la surface assimilatrice.

- *Coût de la tige feuillée par unité de surface (CC_A)*

La Figure 4-7 représente la gamme de variabilité interspécifique du coût de la mise en place de la surface assimilatrice (g glucose m⁻²) des espèces tempérées étudiées (**Annexe A, Annexe C et Annexe E**).

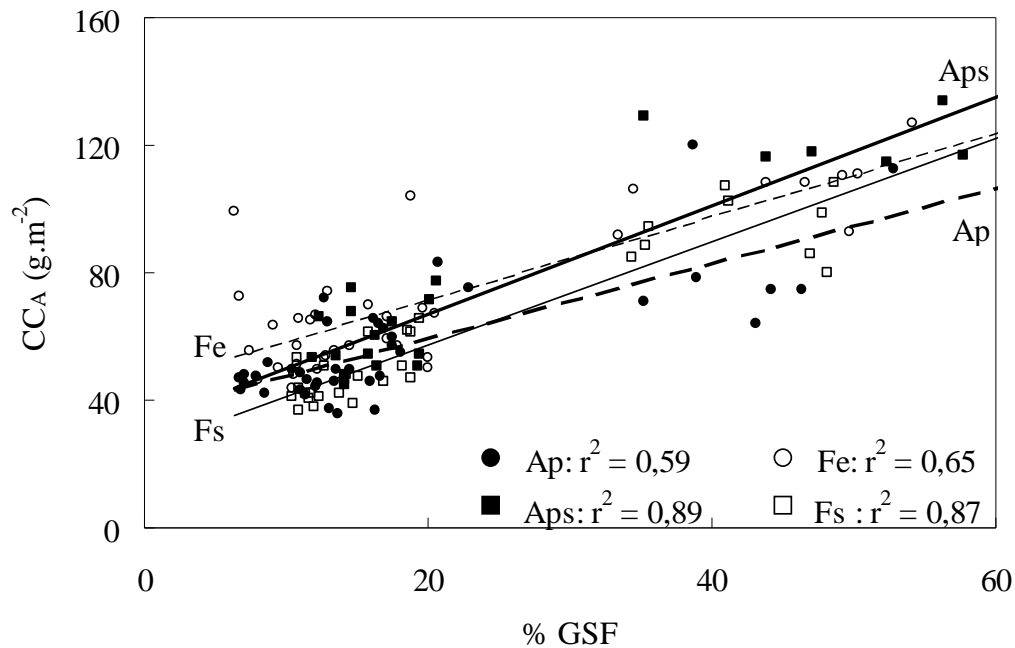


Figure 4-7 : Relation entre le climat lumineux (Facteur Global du Site, GSF) et le coût de mise en place de la surface assimilatrice (g m⁻²) pour *A. platanoides* (ronds noirs, n = 40), *A. pseudoplatanus* (carrés noirs, n = 25), *F. excelsior* (ronds blancs, n = 36) et *F. sylvatica* (carrés blancs, n = 30). Les coefficients de détermination (r²) et les régressions linéaires ne sont représentés que lorsque l'effet de la lumière est significatif (p < 0,05).

Il y a une large plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice chez les quatre espèces tempérées étudiées. Dans les trouées, déployer 1m² de feuilles nécessite 110 à 140 g de glucose, tandis qu'à l'ombre, déployer 1 m² de feuilles ne coûte plus que 40 à 60 g de glucose. Les différences peuvent varier d'un facteur 3,5.

Le coût associé au déploiement de la surface assimilatrice diminue donc fortement avec l'ombrage, particulièrement pour les espèces tolérantes (*F.sylvatica* et *A. pseudoplatanus*) avec des coefficients directeurs supérieurs à 1,6. Pour les quatre espèces tempérées étudiées

ici, la forte augmentation du SLA avec l'ombrage et l'augmentation de l'allocation de biomasse vers les feuilles et les pétioles expliquent la majeure partie de la plasticité du coût de la tige feuillée par unité de surface. En outre, une diminution du CC des feuilles de *F. sylvatica* et d' *A. platanoïdes* contribue également à la diminution globale du coût nécessaire à la mise en place de la surface assimilatrice avec l'ombrage.

La plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice reflète le tempérament des espèces dans cette étude. Cette plasticité trouve ses origines dans la plasticité de la surface spécifique des feuilles (SLA), trait contrôlant également la croissance des plantes par le biais de l'assimilation photosynthétique et l'interception de lumière basés sur la surface.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le coût de construction est défini en tant que quantité de glucose exigée pour fournir des squelettes de carbone, des réducteurs et de l'ATP pour synthétiser les composés organiques dans un tissu par l'intermédiaire des voies biochimiques standards (Williams *et al.* 1987; Chapin III 1989). Le coût associé au déploiement de la surface assimilatrice est calculé en sommant les coûts de construction des organes de la tige feuillée annuelle (limbes, pétioles ou rachis et axes de l'année) exprimé par unité de surface foliaire.

Notre hypothèse de travail était basée sur le fait que la capacité des jeunes arbres à réduire leur coût nécessaire au déploiement de leur surface assimilatrice contribuait à leur capacité à tolérer l'ombrage.

Ce travail a été réalisé *in situ* sur des juvéniles installés au tempérament différent. Dans un premier temps, nous avons étudié les différences interspécifiques du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice. Dans un second temps, nous avons caractérisé la plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice dans des conditions d'ombrage plus ou moins intense. Nous avons ensuite étudié si les variations des coûts associés renouvellement de la surface assimilatrice étaient dues à des changements de composition biochimique (changements de coûts de construction des tissus par unité de masse) ou à des modifications morphologiques de la tige feuillée (surface spécifique des feuilles, allocation de biomasse aux limbes, rachis, pétioles et tiges au sein de la tige feuillée).

Nous observons de grandes différences interspécifiques du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice parmi les différentes espèces partageant le même environnement. Les feuilles sont les organes qui contribuent le plus au coût associé au déploiement de la surface assimilatrice en raison de leur coût élevé et de leur forte participation dans la biomasse de la tige feuillée. D'autre part, le coût associé au déploiement de la surface assimilatrice est exprimé par unité de surface de feuilles. Nous observons également des différences interspécifiques de coût de construction des feuilles et des différents composés biochimiques. Les principaux constituants à l'origine de ces différences interspécifiques de coût de construction des feuilles sont les minéraux et les lignines. Ces deux composés sont eux même négativement corrélés entre eux. Cependant, malgré la variabilité interspécifique du coût des feuilles et malgré la forte contribution massique des feuilles au sein de la tige feuillée, il n'y a pas de corrélation entre le coût de construction des feuilles et le coût de la mise en place de la

surface assimilatrice. Surtout, la surface spécifique des feuilles est très différente selon les espèces. Les espèces qui ont les plus grandes surfaces spécifiques ont les plus faibles coûts associés au déploiement de la surface assimilatrice et inversement les espèces qui ont les plus petites surfaces spécifiques ont les plus forts coûts associés au déploiement de la surface assimilatrice. Les différences interspécifiques de coûts de construction associés au déploiement de la surface assimilatrice sont surtout dues aux différences interspécifiques de la surface spécifique des feuilles.

Cependant ce coût associé au déploiement de la surface assimilatrice n'est pas lié au tempérament des espèces que nous avons étudiées. L'hypothèse que la tolérance à l'ombrage est associée à une diminution du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice n'est pas vérifiée, il faudrait utiliser une gamme d'espèces plus large appartenants à des groupes fonctionnels plus contrastés.

Pour toutes les espèces étudiées le long d'un gradient de lumière, nous observons une grande plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice. De plus, nous mettons en évidence une diminution du coût de construction des feuilles avec l'ombrage chez *A. platanoides.* et *F. sylvatica.*, principalement due à une diminution de la teneur en composés phénoliques chez *A. platanoides.* Les spectres d'absorbance des composés phénoliques diffèrent suivant les espèces, ils mériteraient une identification plus précise de la nature des différents composés phénoliques. La surface spécifique des feuilles est le principal facteur à l'origine des variations du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice. Les espèces tolérantes à l'ombrage sont plus plastiques au niveau du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice que les espèces hémitolérantes.

Nous avons travaillé *in situ* et nous n'avons pas pu empêcher toutes les interactions possibles avec d'autres facteurs écologiques. En particulier le fait de ne pas maîtriser la nature de la nutrition azotée nous empêche peut-être de voir des différences des coûts de construction ou au contraire nous montre des différences alors qu'il n'y en a pas. Pour remédier à ce problème, il nous faudrait tenir compte des préférences nutritionnelles des espèces. Mais dans la littérature les données ne sont pas disponibles pour toutes les espèces, et lorsqu'elles sont disponibles, elles concernent soit les arbres adultes (difficilement comparables aux juvéniles *in situ*), soit des expérimentations conduites sur des juvéniles en conditions contrôlées (difficilement comparables aux conditions naturelles).

Notre définition du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice, tiens compte des structures porteuses mais ne prends pas en compte les structures d'absorption et de conduction qui sont pourtant nécessaires au fonctionnement de la surface assimilatrice. Il faudrait considérer en plus le coût des racines, des symbiontes qui y sont associés et le coût de la croissance secondaire des tiges les années précédentes (par datation des plants). Néanmoins, cela supposerait de connaître avec précision l'âge des juvéniles ce qui n'est pas aisé en conditions naturelles du fait de leur très faible croissance sous couvert.

Dans la notion de coût de construction, les estimations sont basées sur l'ensemble des tissus des organes assimilateurs. Or ces tissus comportent des composés de structure fixés et des composés solubles, plus mobiles qui pouvant être remobilisés. Une estimation du CC devrait s'attacher essentiellement aux premiers, les seconds étant déjà (en partie) produits et n'ont pas de coût. Des variations saisonnières du CC peuvent être dues à des changements de teneur en amidon, qui ne devrait en toute rigueur pas être pris en compte dans l'estimation du coût (il faudrait calculer le % de TNC et les soustraire).

Nous utilisons le coût associé au déploiement de la surface assimilatrice comme un indicateur du rapport entre le coût et le bénéfice et donc comme un indicateur du temps nécessaire au remboursement de l'énergie investie dans la mise en place de cette surface assimilatrice. Pour cela, nous assimilons le gain de carbone à la surface assimilatrice.

Les deux hypothèses sous-jacentes sont d'une part qu'il y a peu de variabilité interspécifique de la capacité photosynthétique qui ne soit pas du à une variation de SLA, d'autre part que la durée de vie des feuilles est comparables chez nos espèces tempérées feuillues étudiées ici. Des mesures de photosynthèse et de respiration permettraient d'estimer l'assimilation nette de carbone de la tige feuillée et donc d'affiner notre estimation du rapport coût/bénéfice. La prise en compte de la durée de vie des feuilles permettrait de calculer le temps nécessaire au remboursement de l'énergie investie dans la mise en place de cette surface assimilatrice.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
A

- Alexandre DY** (1979) Etude de la répartition spatiale de l'éclairement du sous-bois, Rapport Orstom
- Amthor JS** (1989) Respiration and crop productivity, New York
- Amthor JS** (2003) Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Annals of Botany* 91:673-695
- Anderson MC** (1964) Light relations of plants communities. *Biological Review* 39:425-486

B

- Baker FS** (1949) A revised tolerance table. *Journal of Forestry* 47:179-181
- Barnes PW, Searles PS, Ballaré CL, Ryel RJ, Caldwell MM** (2000) Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum* 109:274-283
- Barthod S, Epron D** (2001) Modulation par la lumière de la croissance et du coût de construction chez les jeunes semis forestiers : cas du Chêne Pédonculé, DEA Environnement Santé Société, Université de Franche Comté.
- Baruch Z, Goldstein G** (1999) Leaf construction cost, nutrient concentration, and net CO₂ assimilation of native and invasive species in Hawaii. *Oecologia* 121:183-192
- Baruch Z, Gómez JA** (1996) Dynamics of energy and nutrient concentration and construction cost in a native and two alien C₄ grasses from two neotropical savannas. *Plant and Soil* 181:175-184
- Bazzaz FA** (1979) The physiological ecology of plant succession. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10:351-371
- Bazzaz FA, Wayne PM** (1994) Coping with environmental heterogeneity: the physiological ecology of tree seedling regeneration across the gap-understorey continuum. In: Caldwell MM, Pearcy RW (eds) *Exploitation of environmental heterogeneity by plants, ecophysiological processes above and below ground: Physiological ecology*. Academic Press, San Diego, p 349–390
- Beaudet M, Messier C** (1998) Growth and morphological responses of yellow birch, sugar maple, and beech seedlings growing under a natural light gradient. *Canadian Journal of Forest Research* 28:1007-1015
- Becker P, Erhart DW, Smith AP** (1989) Analysis of forest light environments 1. Computerized estimation of solar radiation from hemispherical canopy photographs. *Agricultural and forest meteorology* 44:217-232

- Bilger W, Veit M, Schreiber L, Schreiber U** (1997) Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101:754-763
- Björkman O** (1981) Responses to different quantum flux densities. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment*. Encyclopaedia of Plant Physiology, Springer-Verlag, Berlin, pp 57-101
- Boardman AD, Aers GC, Teshima R** (1981) Retarded edge modes of a parabolic wedge. The American Physical Society
- Boardman NK** (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology* 28:355-377
- Bréda NJJ** (2003) Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. *Journal of Experimental Botany* 54:2403-2417
- Burchard P, Bilger W, Weissenböck G** (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* 23:1373-1380
- Burns RM, Honkala BH** (1990) *Silvics of North America. 2. Hardwoods*. Department of Agriculture, Forest Service, Washington

C

- Canham CD** (1988) An index for understorey light levels in and around canopy gaps. *Ecology* 69:1634-1638
- Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul JL, Barbottin A, Jeuffroy MH, Gate P, Agati G** (2005) Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 91, 35-49.
- Cerovic ZG, Ounis A, Cartelat A, Latouche G, Goulas Y, Meyer S, Moya I.** (2002). The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment* 25, 1663-1676
- Chabot BF, Jurik TW, Chabot JF** (1979) Influence of Instantaneous and Integrated Light-Flux Density on Leaf Anatomy and Photosynthesis. *American Journal of Botany* 66:940-945
- Chapin III SF** (1989) The cost of tundra plant structures: evaluation of concepts and currencies. *American Naturalist* 133:1-19
- Chazdon RL, Field CB** (1987) Photographic estimation of photosynthetically active radiation: evaluation of a computerized technique. *Oecologia* 73:525-532
- Chen HYH, Klinka K, Kayahara G** (1996) Effects of light on growth, crown architecture, and specific leaf area for naturally established *Pinus contorta* var. *latifolia* and *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* saplings. *Canadian journal of forest research* 26:1149-1157

Chen JM, Rich PM, Gower TS, Norman JM, Pulmmer S (1997) Leaf area index on boreal forests: theory, techniques and measurements. *Journal of Geophysics Research* 102:429-444

Cornelissen JHC, Werger MJA, Castro-Diez P, van Rheeën JWA, Rowland AP (1997) Foliar nutrients in relation to growth, allocation and leaf traits in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* 111:460-469

D

Delagrangé S, Montpied P, Dreyer E, Messier C, Sinoquet H (2006) Does shade improve light interception efficiency? A comparison among seedling from shade-tolerant and -intolerant temperate deciduous tree species. *New Phytologist*

Duchiron MS (1994) Gestion des futaies irrégulières et mélangées

Ducrey M (1975a) Utilisation des photographies hémisphériques pour le calcul de la perméabilité des couverts forestiers au rayonnement solaire. I. Analyse technique de l'interception. *Annales des Sciences Forestières* 32:73-92

Ducrey M (1975b) Utilisation des photographies hémisphériques pour le calcul de la perméabilité des couverts forestiers au rayonnement solaire. II. Etude expérimentales. *Annales des Sciences Forestières* 32:205-221

Dufrêne E, Bréda NJJ (1995) Estimation of deciduous forest leaf area index using direct and indirect methods. *Oecologia* 104:152-162

E

Eamus D, Myers B, Duff G, Williams R (1999) A cost-benefit analysis of leaves of eight Australian savanna tree species of differing leaf life-span. *Photosynthetica* 36:575-586

Eamus D, Prichard H (1998) A cost-benefit analysis of leaves of four Australian savanna species. *Tree Physiology* 18:537-545

Ellenberg H (1979) Man's Influence on Tropical Mountain Ecosystems in South America: The Second Tansley Lecture. *Journal of Ecology* 67:401-416

Evans JR, Poorter H (2001) Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment* 24:755-767

F

Farque L, Sinoquet H, Colin F (2001) Canopy structure and light interception in *Quercus petraea* seedlings in relation to light regime and plant density. *Tree Physiology* 21:1257-1267

Fernandes R, Miller J, Chen J, Rubinstein I (2003) Evaluating image-based estimates of leaf area index in boreal conifer stands over a range of scales using high resolution CASI imagery. *Remote Sensing of Environment* 89

Foggie A (1960) Natural regeneration in the humid tropical forest. Caribbean Forest. In: Bongers F, Parren MPE, Swaine MD, Traoré D (eds) Forest climbing plants of West Africa: introduction, vol 21

Frazer GW, Canham CD (1999) GLA version 2: Gap Light Analyzer. Copyright © 1999: Simon Frazer. In. University, Burnaby, British Columbia, and the Institute of Ecosystem Studies, Millbrook, New York

G

Gary C, Bertin N, Frossard JS, Le Bot J (1998a) High mineral contents explain the low construction cost of leaves, stems and fruits of tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 49:49-57

Gary C, Le Bot J, Frossard JS, Andriolo JL (1998b) Ontogenetic changes in the construction cost of leaves, stems, fruits, and roots of tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 49:59-68

Givnish TJ (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 15:63-92

Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I (2004) Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics* 43:4488-4496

Griffin KL (1994) Calorimetric estimates of construction cost and their use in ecological studies. *Functional Ecology* 8:551-562

Griffin KL, Thomas RB, Strain BR (1993) Effects of nitrogen supply and elevated carbon dioxide on construction cost in leaves of *Pinus taeda* (L.) seedlings. *Oecologia* 95:575-580

Grubb PJ, Metcalfe DJ (1996) Adaptation and Inertia in the Australian Tropical Lowland Rain-Forest Flora: Contradictory Trends in Intergeneric and Intrageneric Comparisons of Seed Size in Relation to Light Demand. *Functional Ecology* 10:512-520

H

Hale SE, Edwards C (2002) Comparison of film and digital hemispherical photography across a wide range of canopy densities. *Agricultural and Forest Meteorology* 112: 51-56

Hikosaka K, Terashima I (1996) Nitrogen Partitioning among Photosynthetic Components and its Consequence in Sun and Shade Plants. *Functional Ecology* 10:335-343

J

Jonckheere I, Nackaerts K, Muys B, Coppin P (2005) Assessment of automatic gap fraction estimation of forests from digital hemispherical photography. *Agricultural and Forest Meteorology* 132:96-114

Jordano P (1995) Angiosperm Fleshy Fruits and Seed Dispersers: A Comparative Analysis of Adaptation and Constraints in Plant-Animal Interactions. *American Naturalist* 145:163-191

K

Kazda M, Salzer J (2000) Leaves of Lianas and Self-Supporting Plants Differ in Mass per Unit Area and in Nitrogen Content. *Plant Biology* 2:268-271

King DA (1990) Allometry of Saplings and Understorey Trees of a Panamanian Forest. *Functional Ecology* 4:27-32

King DA (1991) Correlations between biomass allocation, relative growth rate and light environment in tropical forest saplings. *Functional Ecology* 5:485-492

King DA (2001) Allocation of above-ground growth is related to light in temperate deciduous saplings. *Functional Ecology* :482-488

King DA (2003) Allocation of above-ground growth is related to light in temperate deciduous saplings. *Functional Ecology* 17:482-488

Kitajima K (1994) Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* 98:419-428

Kneeshaw DD, Kobe RK, Coates KD, Messier C (2006) Sapling size influences shade tolerance ranking among southern boreal tree species. *Journal of Ecology* 94:471-480

Kobe RK (1996) Intraspecific variation in sapling mortality and growth predicts geographic variation in forest composition. *Ecological monographs* 66:181-201

Kobe RK, Coates KD (1997) Models of sapling mortality as a function of growth to characterize interspecific variation in shade tolerance of eight tree species of northwestern British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* 27:227-236

Kobe RK, Pacala SW, Silander JA, Canham CD (1995) Juvenile tree survivorship as a component of shade tolerance. *Ecological Applications* 5:517-532

Kolb CA, Käser MA, Kopechy J, Gerhard Z, Riederer M, Pfündel EE (2001) Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* 127:863-875

Krause GH, Gallé A, Gademann R, Winter K (2003a) Capacity of protection against ultraviolet radiation in sun and shade leaves of tropical forest plants. *Functional Plant Biology* 30:533-542

Krause HG, Grube E, Virgo A, Winter K (2003b) Sudden exposure to solar UV-B radiation reduces net CO₂ uptake and photosystem 1 efficiency in shade-acclimated tropical tree seedlings. *Plant Physiology* 331:745-752

Kull O, Tulva I (2002) Shoots structure and growth along a vertical profile within a *Polypulus-Tilia* canopy. *Tree Physiology* 22:1167-1175

L

- Lafitte HR, Loomis RS** (1988) Calculation of growth yield, growth respiration and heat content of grain Sorghum from elemental and proximal analyses. *Annals of Botany* 62:353-361
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL** (1999) Book Reviews. *Journal of Ecology* 87:925
- Landhäusser SM, Lieffers VJ** (2001) Photosynthesis and carbon allocation of six boreal tree species grown in understory and open conditions. *Tree Physiology* 21:243-250
- Lin J, Harcombe P, Fulton M, Hall R** (2002) Sapling growth and survivorship as a function of light in a mesic forest of southeast Texas, USA. *Oecologia* 132:428-435
- Loach K** (1967) Shade Tolerance in Tree Seedlings. I. Leaf Photosynthesis and Respiration in Plants Raised Under Artificial Shade. *New Phytologist* 66:607-621

M

- Machado JL, Reich PB** (1999) Evaluation of several measures of canopy openness as predictors of photosynthetic photon flux density in deeply shaded conifer-dominated forest understory. *Canadian Journal of Forest Research* 29:1438-1444
- Markstädter C, Queck I, Baumeister J, Riederer M, Schreiber U, Bilger W** (2001) Epidermal transmittance of leaves of *Vicia faba* UV radiation as determined by two different methods. *Photosynthesis Research* 67:17-25
- Mazza CA, Bocalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL** (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122:117-125
- McDermitt DK, Loomis RS** (1981) Elemental composition of biomass and its relation to energy content, growth efficiency, and growth yield. *Annals of Botany* 48:275-290
- McDonald AJS, Ericsson A, Lohammar T** (1986) Dependence of starch storage on nutrient availability and photon flux density in small birch *Betula pendula* Roth. *Plant, Cell and Environment* 9:443-438
- Merino J, Field CB, Mooney HA** (1982) Construction and maintenance costs of mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. I. Growth and CO₂ exchange analysis. *Oecologia* 53:208-213
- Merino JA** (1987) The costs of growing and maintaining leaves of Mediterranean plants. In: Tenhunen JD, Catarino FM, Lange OL, Oechel WC (eds) *Plant responses to stress: functional analysis in Mediterranean ecosystems*, Springer-Verlag, Berlin
- Merino JA, Field CB, Mooney HA** (1984) Construction and maintenance costs of mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. II. Biochemical pathway analysis. *Acta Oecologica* 5:211-229
- Messier C, Doucet R, Ruel J-C, Claveau Y, Kelly C, Lechowicz MJ** (1999) Functional ecology of advance regeneration in relation to light in boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research* 29:812-823
- Messier C, Puttonen P** (1995) Spatial and temporal variation in the light environment of developing Scots pine stands: the basis for a quick and efficient method of characterizing light. *Canadian journal of forest research* 25:343-354

Millet J, Bouchard A, Édelin C (1998) Plagiotropic architectural development of four tree species of the temperate forest. *Canadian Journal of Botany* 76:2100–2118

N

Nagel JM, Griffin KL (2001) Construction cost and invasive potential: comparing *Lythrum salicaria* (Lythraceae) with co-occurring native species along pond banks1. *American Journal of Botany* 88:2252-2258

Nagel JM, Griffin KL, Schuster WSF, Tissue DT, Turnbull MH, Brown KJ, Whitehead D (2002) Energy investment in leaves of red maple and co-occurring oaks within a forested watershed. *Tree Physiology* 22:859

Navas ML, Ducout B, Roumet C, Richarte J, Garnier J, Garnier E (2003) Leaf life span, dynamics and construction cost of species from Mediterranean old-fields in successional status. *New Phytologist* 159:213-228

Niinemets Ü (2006) The controversy over traits conferring shade-tolerance in trees: ontogenetic changes revisited. *Journal of Ecology* 94:464-470

Niinemets Ü (1997) Acclimatation to low irradiance in *Picea abies*: influences of past and present light climate on foliage structure and function. *Tree Physiology* 17:723-732

Niinemets Ü (1998) Adjustment of foliage structure and function to a canopy light gradient in two co-existing deciduous trees. Variability in leaf inclination angles in relation to petiole morphology. *Trees* 12:446- 451

Niinemets Ü, Kull O (1998) Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity. *Tree Physiology* 18:467-479

Niinemets Ü, Kull O (1999) Biomass investment in leaf lamina versus lamina support in relation to growth irradiance and leaf size in temperate deciduous trees. *Tree Physiology* 19:349-358

Niinemets Ü, Valladares F, Ceulemans R (2003) Leaf-level phenotypic variability and plasticity of invasive *Rhododendron ponticum* and non-invasive *Ilex aquifolium* co-occurring at two contrasting European sites. *Plant, Cell and Environment* 26: 941-956.

O

Otto HJ (1997) Les forêts de Basse-Saxe en Allemagne du nord : un passé difficile commande une gestion nouvelle. 2 : le programme gouvernemental Löwe, principes d'une sylviculture proche de la nature. *Revue Forestière Française* 49:477-488

P

Pearcy RW, Sims DA (1994) Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant. In: Caldwell MM, Pearcy RW (eds) *Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants: Ecophysiological Processes Above- and Belowground*. Academic Press, New York, pp 145-174

- Pearcy RW, Valladares F, Wright SJ, Lasso De Paulis E** (2004) A functional analysis of the crown architecture of tropical forest *Psychotria* species: do species vary in light capture efficiency and consequently in carbon gain and growth? *Oecologia* 139:163-177
- Peng S, Eissenstat DM, Graham JH, Williams K, Hodge NC** (1993) Growth Depression in Mycorrhizal Citrus at High-Phosphorus Supply (Analysis of Carbon Costs). *Plant Physiology* 101:1063-1071
- Penning de Vries FWT** (1983) Modeling of growth and production. In *Physiological Plant Ecology*. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) IV, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol 12D, Springer-Verlag, Berlin, pp 117-150
- Penning De Vries FWT, Brunsting AHM, van Laar HH** (1974) Products, requirements and efficiency of biosynthesis: a quantitative approach. *Journal of Theoretical Biology* 45:339-377
- Pickup M, Westoby M, Basden A** (2005) Dry mass costs of deploying leaf area in relation to leaf size. *Functional Ecology* 19:88-97
- Planchais I, Sinoquet H** (1998) Foliage determinants of light interception in sunny and shaded branches of *Fagus sylvatica* (L.). *Agricultural and Forest Meteorology* 89:241-253
- Poorter H** (1994) Construction costs and payback time of biomass: a whole plant perspective. In: Roy J, Garnier E (eds) *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. SPB, The Hague, pp 111-127
- Poorter H, Bergkotte M** (1992) Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant, Cell and Environment* 15:221-229
- Poorter H, de Jong R** (1999) A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* 143:163-176
- Poorter H, Evans JR** (1998) Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia* 116:26-37
- Poorter H, Pepin S, Rijkers T, de Jong Y, Evans JR, Körner C** (2006) Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *Journal of Experimental Botany* 57:355-371
- Poorter H, Van Berkel Y, Baxter B, Bel M, Den Hertog J, Dijkstra P, Gifford RM, Griffin KL, Roumet C, Wong SC** (1997) The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant Cell Environ* 20:472-482
- Poorter H, Villar R** (1997) The fate of the acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs. In: *Plant Resource Allocation*. Academic Press, pp 39-72
- Poorter L** (2001) Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species. *Functional Ecology* 15:113-123
- Poorter L, Rose SA** (2005) Light-dependent changes in the relationship between seed mass and seedling traits: a meta-analysis for rain forest tree species. *Oecologia* 142:378-387
- Poorter L, Werger MJA** (1999) Light environment, sapling architecture, and leaf display in six rain forest tree species. *American Journal of Botany* 86:1464-1473

P'yankov VI, Ivanov LA, Lambers H (2001) Plant Construction Cost in the Boreal Species Differing in Their Ecological Strategies. *Russian Journal of Plant Physiology* 48:67-73

R

Rameau J, Mansion M, Dumé G (1993) Flore forestière française, guide écologique illustré, Institut pour le développement forestier, Paris edn

Reich PB, Buschena C, Tjoelker MG, Wrage K, Knops J, TilmanbD, Machado JL (2003) Variation in growth rate and ecophysiology among 34 grassland and savanna species under contrasting N supply: a test of functional group differences. *New Phytologist* 157:617-631

Reich PB, Ellsworth DS, Walters MB (1998) Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Functional Ecology* 12:948-958

Rich PM, Clark DB, Clark DA, Oberbauer SF (1993) Long-term study of solar radiation regimes in a tropical wet forest using quantum sensors and hemispherical photography. *Agricultural and Forest Meteorology* 65

Rollet B (1969) La régénération naturelle en foret dense humide sempervirente de plaine de la Guyane Venezuelienne. *Bois et Forets des Tropiques* 14:19-38

Roussel L (1953) Recherches théoriques et pratiques sur la répartition, en quantité et en qualité, de la lumière dans le milieu forestier - Influence sur la végétation. *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts de Nancy XIII*:295-40

S

Sims DA, Pearcy RW (1991) Photosynthesis and respiration in *Alocasia macrorrhiza* following transfers to high and low light. *Oecologia* 86:447-453

Sobrado MA (1991) Cost-Benefit Relationships in Deciduous and Evergreen Leaves of Tropical Dry Forest Species. *Functional Ecology* 5:608-616

Spellmann H (1992) Concepts for mixed stand studies. In: Proceedings from the iufro conference, Berlin-Eberswalde, p 10 p

Stenberg P (1996) Correcting LAI-2000 estimates for the clumping of needles in shoots of conifers. *Agricultural and Forest Meteorology* 79:1-8

T

Tilman D (1999) The Ecological Consequences of Changes in Biodiversity: A Search for General Principles. *Ecology* 80:1455-1474

V

- Valladares F, Chico J, Aranda I, Balaguer L, Dizengremel P, Manrique M, Dreyer E** (2002) The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees* 16:395-403
- Veneklaas EJ, Poorter L** (1998) Growth and carbon partitioning of tropical tree seedlings in contrasting light environments. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren M (eds) *Inherent variation in plant growth: physiological mechanisms and ecological consequences*. Backhuys, Leiden, pp 337-362
- Vertregt N, Penning De Vries FWT** (1987) A Rapid method for determining the efficiency of biosynthesis of plant biomass. *Journal of Theoretical Biology* 128:109-119
- Veziņa PE** (1960) Recherches sur les conditions de lumière et de précipitations dans les forêts traitées par les coupes progressives par groupes. *Mémoires de l'Institut Suisse de Recherches Forestières* 36:37-137
- Villar R, Merino J** (2001) Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytologist* 151:213-226

W

- Walters MB, Reich PB** (1999) Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? *New Phytologist* 143:143-154
- Welander N, Ottosson B** (1998) The influence of shading on growth and morphology in seedlings of *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L. *Forest Ecology and Management* 107:117-126
- Williams KF, Field CB, Mooney HA** (1989) Relationships among leaf construction cost, leaf longevity and light environment in rain-forest plants of the Genus *Piper*. *The American Naturalist* 133:198-211
- Williams KF, Percival F, Merino J, Mooney HA** (1987) Estimation of tissue construction cost from heat of combustion and organic nitrogen content. *Plant, Cell and Environment* 10:725-734
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, 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, P'yankov PI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R** (2004) The worldwide leaf economics spectrum, *Nature* 428, :821-827
- Wyckoff PH, Clark JS** (2000) Predicting tree mortality from diameter growth: a comparison of maximum likelihood and Bayesian approaches. *Revue canadienne de recherche forestière* 30:156-167
- Wyckoff PH, Clark JS** (2002) Growth and mortality for seven co-occurring tree species in the southern Appalachian Mountains. *Journal of Ecology* 90:604-615

Sites Internet :

Site 1 : WWF, France Nature Environnement, Greenpeace, Réserves Naturelles de France,
“Charte partenariale pour la restauration des forêts après tempêtes »- septembre 2000

<http://www.wwf.fr/content/download/456/2122/version/1/file/chartefore.pdf>

Site consulté le 3 septembre

Site 2 : Ecofog – Cirad - Base de données des espèces de Guyane

<http://ecofog.cirad.fr/Mariwenn/Mariwenn>,

Site consulté le 3 septembre

Site 3 : Institute of Ecosystem Studies (IES)- Gap Light Analyzer (Version 2.0) software

<http://www.ecostudies.org/gla>

Site consulté le 3 septembre

Site 4 : Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie - Biologie et Multimédia

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/06-facteurs.htm>

Site consulté le 3 septembre, dernière modification : 30 mai 2006

Annexe A: Article accepté dans Annals of Forest Sciences

Sandrine Barthod et Daniel Epron (2005) Variations of construction cost associated to leaf area renewal in saplings of two co-occurring temperate tree species (*Acer platanoides L.* and *Fraxinus excelsior L.*) along a light gradient, Annals of Forest Sciences, 62 pp 545-5.

Variations of construction cost associated to leaf area renewal in saplings of two co-occurring temperate tree species (*Acer platanoides* L. and *Fraxinus excelsior* L.) along a light gradient

Sandrine BARTHOD^a, Daniel EPRON^{b*}

^a Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biologie Environnemental, EA 3184 USC INRA, Pôle universitaire, BP 71427, 25211 Montbéliard Cedex, France

^b Université Henri Poincaré – Nancy 1, UMR 1137 INRA – UHP Ecologie et Écophysologie Forestières, BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex, France

(Received 15 June 2004; accepted 14 January 2005)

Abstract – The yearly renewal of leaves and their holding organs (the leafy shoot) represent an energetic cost for saplings. The contribution of both biochemical (tissue construction cost, CC) and morphological traits (biomass partitioning and leaf mass per unit area, LMA) to the cost associated with leaf area renewal (construction cost of the leafy shoot per unit leaf area, shoot CC_A) was studied in saplings of *Acer platanoides* L. and *Fraxinus excelsior* L. growing in a natural light gradient below forest canopy. Decrease in LMA with shade and change in biomass partitioning from stems towards leaves and petioles accounted for the strong decrease in mass per unit area of the leafy shoot (SMA) with shade and for most of the plasticity of shoot CC_A in both species. In addition, a decrease in leaf CC in *A. platanoides* also contributed to the overall decrease of shoot CC_A with shade in this species. Leaf CC was positively correlated with LMA in *F. excelsior*, positively correlated with both LMA and epidermal absorbance of UV (A_{UV}) in *A. platanoides*. Leaf CC was negatively correlated with ash content in both species. The strong negative correlation between A_{UV} and nitrogen content might have damped variations in leaf CC in *F. excelsior*.

Acer platanoides L. / *Fraxinus excelsior* L. / construction cost / shade tolerance / forest regeneration

Résumé – Variations du coût de construction associées au renouvellement de la surface foliaire chez de jeunes plants de deux espèces sympatriques de forêt tempérée (*Acer platanoides* L. et *Fraxinus excelsior* L.) le long d'un gradient de lumière. Le renouvellement des feuilles et des structures nécessaires à leur maintien (l'ensemble correspondant à la tige feuillée) représente chaque année un coût pour les plants. La contribution de la composition biochimique (coût de construction des tissus, CC) et des caractéristiques morphologiques (répartition de la biomasse, masse des feuilles par unité de surface, LMA) aux changements du coût associé à l'étalement des feuilles (coût de construction de la tige feuillée, par unité de surface foliaire, CC_A) a été étudiée chez de jeunes plants de *Acer platanoides* L. et *Fraxinus excelsior* L. croissant dans un gradient naturel de lumière sous un couvert forestier. Une diminution de LMA avec l'ombrage et des modifications de répartition de biomasse au profit des feuilles et des pétioles et au détriment de la tige expliquent la forte diminution de la masse de la tige feuillée de l'année par unité de surface foliaire (SMA), et l'essentiel de la plasticité observée pour CC_A de la tige feuillée chez les deux espèces. En plus, une diminution du coût de construction des feuilles chez *A. platanoides* contribue également à la diminution de CC_A de la tige feuillée avec l'ombrage chez cette espèce. Le coût de construction des feuilles est positivement corrélé à LMA chez *F. excelsior*, positivement corrélé à LMA et à l'absorbance de l'épiderme dans l'UV (A_{UV}) chez *A. platanoides*. CC des feuilles est négativement corrélé au contenu en cendre chez les deux espèces. La forte corrélation négative entre A_{UV} et le contenu en azote pourrait tamponner les variations de CC des feuilles chez *F. excelsior*.

Acer platanoides L. / *Fraxinus excelsior* L. / coût de construction / tolérance à l'ombrage / régénération forestière

1. INTRODUCTION

Forest canopy constitutes a complex spatial arrangement of foliage and branches, which results in low and variable light penetration down to the forest floor. Light is one of the most limiting resources for forest understorey [4, 25, 29]. Shade limits severely growth and survival of tree saplings, but among species, there is a large inter-specific variability in the degree of tolerance to shade. The ability of trees to acclimate to shade is important for understanding dynamics of forest succession

and determining the fate of juvenile trees during natural regeneration.

One of the components of shade tolerance resides in the ability of saplings to maintain a positive carbon balance by optimising carbon gain under low light environments (increasing light interception and photosynthesis) and by minimising respiratory carbon loss [14, 25]. Leaves display a large plasticity in response to shade characterised by many structural and physiological changes. Especially, the decrease in leaf mass per unit area (LMA) is thought to account for lower nitrogen content

* Corresponding author: Daniel.Epron@sbiol.uhp-nancy.fr

per unit leaf area and lower photosynthetic capacity, but also for lower rate of respiration that would allow higher net CO₂ assimilation rates at low irradiance [5].

Whole plant carbon balance depends not only on the photosynthetic capacity of individual leaves, but also on their ability of intercepting light energy, on the energetic costs of producing and maintaining their assimilatory area as well as their non-photosynthetic organs, and on the pattern of resource allocation among these organs [14, 25]. Light interception depends on leaf area expansion and branch extension and the setting up of a new leafy shoot represents an annual energy investment for temperate saplings [19]. Leaves often exhibit high construction cost because of their high protein contents associated to photosynthesis [33, 39] and their yearly renewal also requires more or less lignified, i.e. more or less expensive organs, like rachis, petioles and stems that constitute the current year shoot [19, 38]. The ability of saplings to reduce this energetic requirement would therefore contribute to their overall shade tolerance.

The objective of this study was to gain a better understanding of the influence of the relative irradiance on the construction cost of leaves and of the different structures that are required for leaf area renewal. Construction cost was defined as the amount of glucose required to provide carbon skeletons, reductants and ATP for synthesizing the organic compounds in a tissue via standard biochemical pathways [9, 44]. It can be accurately estimated by determining ash and carbon content of plant materials assuming that expensive compounds are more reduced than cheaper ones, and that the reduction state of different compounds is reflected by their carbon content [20, 22, 30, 41]. Cost associated to leaf area renewal was expressed on a per unit leaf area basis. We further investigate whether variations in costs associated to leaf area renewal were due to changes in biochemical composition (changes in tissue construction cost per unit mass) or to modifications in leaf morphology (leaf mass per unit area, LMA) or in biomass allocation between leaves (or leaflets) and supporting structures (rachis, petioles and stems). The study was done on saplings of two co-occurring deciduous temperate tree species *Fraxinus excelsior* L. and *Acer platanoides* L. Both were post pioneer species, rated as intermediate in shade tolerance [35] but *A. platanoides* has simple leaves and plagiotropic lateral axes whereas *F. excelsior* has compound leaves and orthotropic lateral axes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Site description

Sampled saplings were growing in a naturally regenerated stand (Graouilly Forest, Moselle, France, 49° 05' N, 6° 02' E, 300 m elevation). The overstorey is dominated by *Acer pseudoplatanus* L. and *Fagus sylvatica* L. In addition to these two species, understorey vegetation consisted of saplings of *Sorbus torminalis* L.; *Sorbus aria* L.; *Acer campestre* L.; *Acer platanoides* L.; *Ulmus glabra*; *Fraxinus excelsior* L. and *Tilia cordata*. Monthly average for air temperature ranged between 1.6 °C in January to 18.7 °C in July and total annual rainfall was 745 mm (data from Météo France, Metz-Augny, 1946–2001 period).

2.2. Estimation of irradiance conditions

Hemispherical photographs were taken above each sapling with a digital camera (Coolpix 4500, Nikon, Japan) equipped with a fisheye

converter (FC-E8, Nikon). The camera was mounted with the lens facing sky, aligned with magnetic north and levelled. Photographs were taken in early morning or late afternoon under condition of diffuse radiation. The hemispheric photographs (3.9 million pixels) were analysed using Gap Light Analyser software (GLA V2.0, Institute of Ecosystem Studies, New York, USA, [7, 12]). The threshold for calculating canopy openness was manually fixed using pixel histograms (lowest frequency value) and visually checked. Potential diffuse (standard overcast) and direct photosynthetic active radiations that are transmitted through the canopy above each sapling were calculated from canopy openness and expressed relative to those above the canopy (T_{dif} and T_{dir} respectively). Sky regions were defined from 8 azimuth classes and 20 zenith classes and the solar time step was set to 2 min. Global Site Factor ($GSF = (T_{dif} + T_{dir})/2$), was calculated assuming an equal proportion of diffuse and direct radiation above the canopy [1, 6, 11], GSF values were averaged over a period starting in May 1st and ending in August 31th.

2.3. Sampling and analysis

Thirty saplings of *Acer platanoides* L. and 26 saplings of *Fraxinus excelsior* L. were sampled in the stand in a large range of light environments in August 2003. The height of sampled saplings was restricted to a range of 0.5 and 1.0 m to limit ontogenic influences on measured parameters.

The current year shoot of each sapling was harvested and stored in an icebox and transferred into a fridge (4 °C) every evening. Shoots were divided into stems, petioles (or rachis) and leaves (or leaflets). Leaf area was measured with a leaf area meter (LI-3000A, Li Cor, Nebraska, USA).

A dual excitation fluorimeter (Dualux® Dual Excitation, prototype CNRS-LURE, France) was used for the non-destructive assessment of phenolics present in leaf epidermis [8, 15]. Briefly, the measurement of leaf epidermal Absorbance of UV light (A_{UV}) is based on the screening effect of the epidermis that absorbs a part of the incident UV light and therefore decreases the amount of available light for chlorophyll fluorescence excitation. An incident red light is used as reference for chlorophyll fluorescence as the leaf epidermis is almost transparent in this spectral region. The leaf is alternatively illuminated by UV (375 nm) and red (655 nm) diodes at a modulation frequency of 1 kHz. Epidermal transmittance of UV was computed from the ratio in diode intensities when both light sources led to the same chlorophyll fluorescence intensity and, absorbance was defined as the base-10 logarithm of the transmittance reciprocal [15]. Absorbance values were recorded on both adaxial and abaxial sides of the leaf and further added for a given leaf. An average value of 10 measurements obtained on a sub-sample of leaves was calculated for each plant (A_{UV}). A tight correlation was found between A_{UV} and the absorbance of a methanolic extract of leaves of the two studied species ($r^2 = 0.85$, $n = 40$, $p < 0.0001$), as previously reported for wheat [8, 15].

Leaf (or leaflet) dry mass was estimated after lyophilisation. Dry mass of other organs (twigs, petioles, rachis) was estimated after oven drying the samples at 60 °C for at least 48 h. All samples were ground to a fine powder and stored dry until analysis. Total carbon and nitrogen were determined with an elemental microanalyser (NCS 2500, Thermoquest, Italy). Ash contents were determined by weighting the remaining mass after combustion in a muffle furnace at 550 °C for 6 h.

2.4. Construction costs

Construction cost (CC, g glucose g⁻¹) was calculated from carbon (C, g g⁻¹) and ash (A, g g⁻¹) contents assuming that the reduction state of organic compounds is related to their carbon content [41]:

$$CC = [-1.041 + 5.077 C / (1-A)] (1-A).$$

For 29 samples covering the whole range of construction cost values, the ash free heat of combustion (H_c , kJ g^{-1}) was measured in a bomb calorimeter (1425, semi micro bomb calorimeter, Parr, Illinois, USA) and further used to calculate CC following the procedure of Williams et al. [44]. Construction costs estimated from carbon content were well correlated with those estimated from heat of combustion ($r^2 = 0.89$, $n = 29$, $p < 0.0001$, data not shown).

Nitrogen content was not taken into account for the calculation of CC, assuming that ammonium is the main nitrogen source. An additional cost for nitrate reduction should be added when nitrate is thought to be the main nitrogen source and when its reduction occurs in non-photosynthetic tissues [30]. The reported values would underestimate true CC if nitrate reduction occurs in roots in these species. Similar N isotope signatures in leaves of both species support the hypothesis that both species are using the same source of nitrogen, and that CC values were similarly biased for both species (unpublished results).

2.5. Calculations and statistical analysis

Leaf mass per unit area (LMA, g m^{-2}) was calculated as the ratio between the leaf dry mass and leaf area of all leaves held by the current year shoot. Shoot mass per unit leaf area (SMA, g m^{-2}) was calculated as the ratio between the dry mass of the current year shoot (leaves, petioles and stems) and the leaf area of this shoot. Leaf construction cost per unit leaf area (leaf CC_A , g glucose m^{-2}) was the product of leaf CC and LMA. The construction cost of the leafy shoot per unit dry mass (shoot CC, g glucose g^{-1}) was calculated by summing, for all organs, the products of their construction cost (CC) and their relative contribution to the biomass of the leafy shoot (RM, g g^{-1}). Construction cost of the leafy shoot per unit leaf area (shoot CC_A , g glucose m^{-2}) was the product of leaf CC and LMA.

Analyses of covariance (ANCOVA) were performed to test for main effects and interaction of species and light (GSF) for all measured variables. If the effect of GSF was significant for a given variable ($p < 0.05$), linear regressions were computed and showed on figures.

Table I. Analyses of covariance of the effects of species and global site factor (GSF) on leaf (or leaflets), petiole (or rachis), stem and the whole leafy shoot construction costs on a per unit mass basis (CC) and relative contributions of leaf, petiole and stem to the biomass of current year shoot, leaf mass per unit area (LMA), shoot mass per unit area (SMA), leaf and leafy shoot construction costs on a per unit area basis (CC_A), leaf nitrogen content (N), leaf ash content and Dualex derived UV absorbance (A_{UV}). F ratio followed by *, ** or *** are significantly higher than unity at 0.05, 0.01 and 0.001 respectively.

	Species	GSF	Sp x GSF
Leaf CC	28.0***	39.4***	5.8*
LMA	0.38	100.3***	6.9*
Leaf CC_A	0.0	112.3***	3.9
Petiole CC	11.9**	1.3	3.8
Stem CC	0.2	1.1	8.0**
Relative leaf mass	4.1*	4.9*	0.1
Relative petiole mass	1.2	12.2**	0.3
Relative stem mass	3.0	12.2**	0.2
Shoot CC	15.7***	40.4***	7.4**
SMA	1.6	73.9***	3.9
Shoot CC_A	1.1	83.3***	2.5
Leaf ash	119.6***	4.1*	0.2
Leaf N	13.5**	9.0**	6.6*
A_{UV}	7.1*	41.0***	1.0

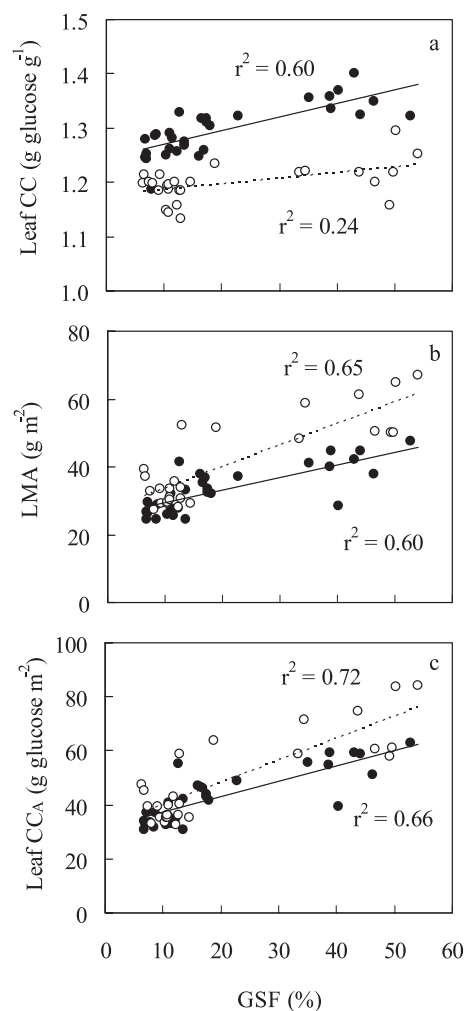


Figure 1. Relationships between irradiance (Global site factor, GSF) and leaf construction cost per unit leaf mass (CC, a), leaf mass per unit area (LMA, b) and leaf construction cost per unit leaf area (CC_A , c) for *A. platanooides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (r^2) and linear regression lines (full line for *A. platanooides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($p < 0.05$).

Pearson correlation coefficients between leaf traits were calculated. All statistical analyses were performed using Stat View 5.1 (SAS Institute Inc, North Carolina, USA).

3. RESULTS

3.1. Leaf construction cost

Saplings of both species were sampled within the same light gradient, with GSF values ranging between 6% and 52%. Unfortunately, intermediate values of GSF (20–40%) were underrepresented for both species.

Leaf construction costs on a per unit mass basis were higher in *A. platanooides* than in *F. excelsior* (1.30 versus 1.20 g glucose g^{-1} respectively for mean values, $p < 0.001$; Tab. I), and decreased with increasing shade ($p < 0.001$; Fig 1a), especially in *A. platanooides*, and to a lesser extent in *F. excelsior*.

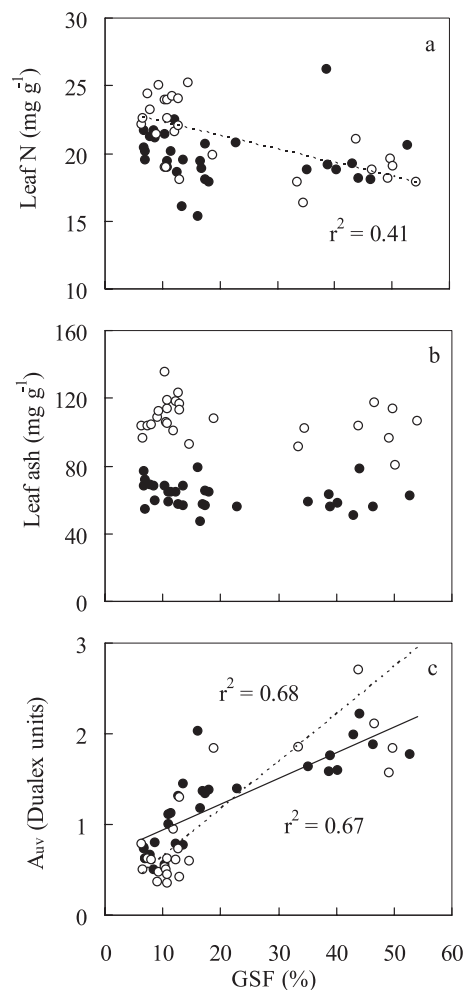


Figure 2. Relationships between irradiance (Global site factor, GSF) and leaf nitrogen content (N, a), leaf ash content (b) and Dualex derived UV absorbance (A_{UV}, c) for *A. platanoides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (r^2) and linear regression lines (full line for *A. platanoides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($p < 0.05$).

Leaf mass per unit area (LMA) decreased significantly with increasing shade ($p < 0.001$; Fig. 1b) especially in *F. excelsior*. Therefore, expressed on a per unit leaf area basis, leaf construction costs (leaf CC_A, g glucose m⁻²) decreased markedly with increasing shade in both species ($p < 0.001$; Fig. 1c). Leaf CC_A were almost similar in the two species. The effect of light on leaf CC_A was more pronounced than on leaf CC due to the effect of shade on LMA.

3.2. Leaf composition

Leaf nitrogen content (N) ranged between 15 to 30 mg g⁻¹ in both species. For *F. excelsior*, N increased with increasing shade, whereas it remained almost constant in *A. platanoides* (Fig. 2a). Leaf ash content slightly decreased with decreasing light in both species ($p = 0.048$; Fig. 2b). In contrast, the Dualex-derived UV absorbance of leaf epidermis (A_{UV}) of

Table II. Pearson's correlation coefficients of leaf construction cost (CC), leaf mass per unit area (LMA), leaf nitrogen content (N), leaf ash content and Dualex derived UV absorbance (A_{UV}) for saplings of *Acer platanoides* (left) and *Fraxinus excelsior* (right). Correlation coefficients (r) followed by *, ** or *** are significantly higher than zero at 0.05, 0.01 and 0.001 respectively.

<i>Fraxinus excelsior</i>				
Leaf CC	+0.55**	+0.34	-0.03	-0.60***
+0.59***	LMA	+0.70***	-0.71***	-0.40*
+0.59***	+0.51**	A _{UV}	-0.72***	-0.25
-0.03	-0.21	-0.51**	N	-0.02
-0.45*	-0.30	0.08	-0.04	Ash
<i>Acer platanoides</i>				

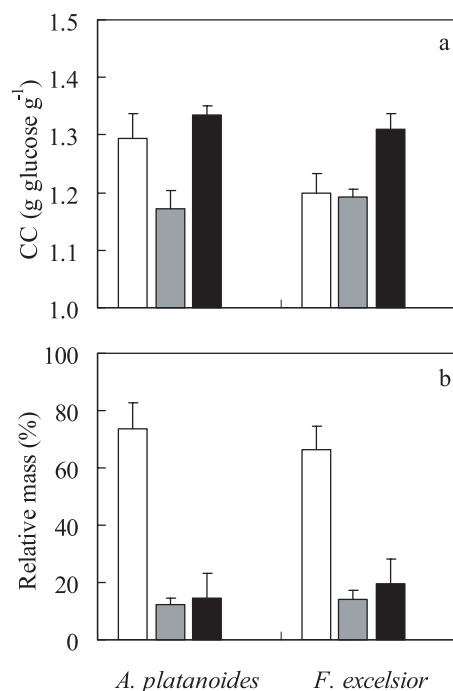


Figure 3. Mean construction cost per unit mass (CC, a) and relative contribution to shoot biomass (b) of leaves or leaflets (open bars), petioles or rachis (hatched bars) and stems (solid bars) for *A. platanoides* ($n = 30$) and *F. excelsior* ($n = 26$). Vertical bars represent standard deviation (\pm SD).

both species significantly decreased with increasing shade ($p < 0.001$; Fig. 2c).

There was no significant correlation between leaf CC and N content (Tab. II). Leaf CC was positively correlated with LMA in *F. excelsior* ($p < 0.001$), and with both LMA and A_{UV} in *A. platanoides* ($p < 0.001$). In contrast, leaf CC was negatively correlated with leaf ash content in both species.

3.3. Shoot construction cost

CC of organs of the leafy shoot other than leaves or leaflets (petioles, rachis, and stems) remained fairly constant with

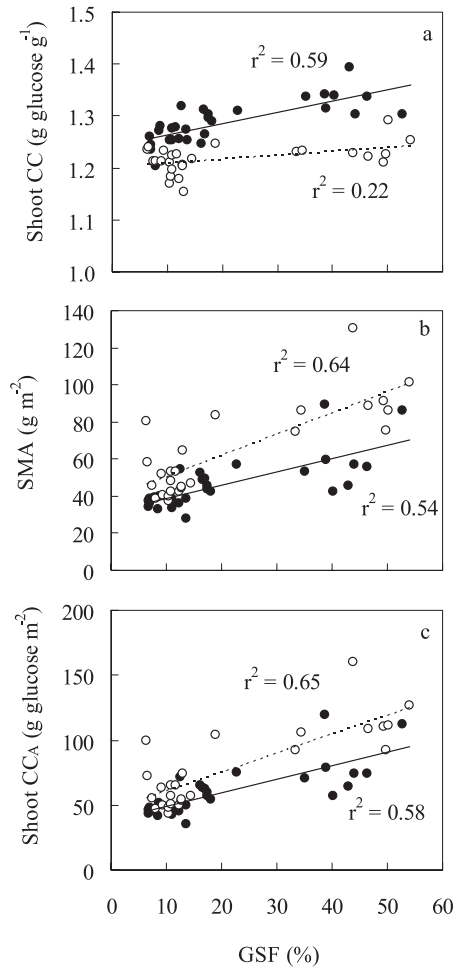


Figure 4. Relationships between irradiance (Global site factor, GSF) and construction cost of the leafy shoot per unit mass (CC, a), shoot mass per unit area (SMA, b) and construction cost of the leafy shoot per unit of leaf area (CC_A, c) for *A. platanoides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (r^2) and linear regression lines (full line for *A. platanoides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($p < 0.05$).

increasing shade, and were almost similar for the two species (Fig. 3a). Stems exhibited higher values of construction cost (1.31 g glucose g⁻¹) than leaflets (1.20) and rachis (1.19) in *F. excelsior*. Construction costs of stems (1.33) were in the same range of values than those of leaves (1.29) while petioles had lower CC in *A. platanoides* (1.17).

Leaves accounted for 74% of the biomass of the current year shoot in *A. platanoides* and 66% in *F. excelsior*. Stems and petioles accounted for respectively 14% and 12% in *A. platanoides* and 20% and 14% in *F. excelsior* (Fig 3b). There was a slight increase in relative leaf and petiole biomass with increasing shade ($p < 0.05$) while relative stem biomass decreased ($p < 0.001$, data not shown). Shoot CC were slightly higher for *A. platanoides* than for *F. excelsior* ($p < 0.001$; Fig. 4a), and decreased significantly with shade, particularly in *A. platanoides* and to a lesser extent in *F. excelsior*.

SMA decreased with shade ($p < 0.001$; Fig. 4b). Therefore, shoot CC_A decreased with increasing shade ($p < 0.001$; Fig. 4c). Shoot CC_A was higher in *F. excelsior* than in *A. platanoides* (on average 6%, $p < 0.001$).

4. DISCUSSION

4.1. Construction cost associated to leaf area renewal

The cost which is associated to leaf area renewal can be defined as the amount of glucose equivalent per unit leaf area that is required for growing a new leafy shoot (shoot CC_A) that will enable light interception and photosynthetic assimilation. The substantial decrease in shoot CC_A that was observed with increasing shade in *A. platanoides* and *F. excelsior* may be ascribed to either morphological changes (decrease in the mass of current year shoot per unit leaf area) or biochemical changes (decrease in organ construction costs).

Low LMA is thought to contribute to shade tolerance because it allows a larger leaf area and a greater light interception for a given biomass investment in leaves [40]. Indeed, low LMA in shaded saplings or in shaded leaves within tree crowns has been well documented in many species [10, 21, 28, 36, 37], and it accounted for lower SMA for the two temperate species studied here. In addition, a shift in aboveground production toward leaves and petioles in shaded saplings was also observed, as already reported for saplings of tropical and temperate species [17–19, 34]. A decrease in relative petiole mass with increasing light was already reported for *F. excelsior* [27] and was also observed in *A. platanoides*. These shifts could result either from ontogenic changes (“apparent plasticity” resulting from difference in the size reached by individuals in the different light environments [19]), or from an optimisation of biomass allocation (“true plasticity”, independent from size mediated effects). Whatever, changes in LMA and in biomass allocation to leaves together account for the reduction of the cost associated to leaf area renewal in *A. platanoides* and *F. excelsior*. As soon as leaflets (in *F. excelsior*) and petioles or rachis (in both species) had lower construction costs than stems, the observed shift in biomass allocation from shoot to leaves and petioles also accounts for the reduction of the construction cost of the shoot. Changes in both leaf structural traits and in allocation towards low-cost tissue decreased the cost associated to leaf area renewal. Any change in chemical composition of organs will reinforce or counterbalance this effect.

4.2. Tissue construction costs

Leaf construction cost of the two studied species was in the range of published values for leaves of woody species from different ecosystems [9, 24, 33, 39]. Leaf CC were higher in *A. platanoides* than in *F. excelsior*. High mineral contents, as revealed by high ash content in leaves of *F. excelsior*, have a null direct cost. It probably explains the low construction cost of leaflets for this species. Similar results have been obtained on tomato leaves [13].

Petioles are cheaper than leaves as already reported [26] while woody stems are more expensive because of their higher lignin content. Assuming NO₃⁻ nutrition rather than NH₄⁺

nutrition, and NO_3^- reduction in non photosynthetic organs, would have yielded higher construction costs for all organs, and especially for leaves (8% higher values). Leaves would then display higher construction costs than stems [30, 33]. However, it would not have changed the overall tendency reported here.

Leaf CC exhibited biochemical plasticity with GSF in *A. platanoides* while it was less pronounced in *F. excelsior*. There is no general rule on the impact of light availability on leaf construction cost. Leaf CC were 10% to 20% higher in gaps than in the understorey in some tropical *Piper* species [43]. On the contrary, leaves of *Alocasia macrorrhiza* were slightly more expensive (5%) in low light than in high light [38]. Changes in LMA with light often results from changes in both thickness and tissue density [28]. The positive correlation between LMA and leaf CC was probably related to an increased amount of lignified cell walls in light due to changes in the relative contribution of palisade and spongy parenchyma, or to a decrease in cell size [3]. In addition, epidermis thickness (lignified cell walls) and cuticle thickness (lipid-rich compounds) are frequently increased with increasing LMA along a light gradient [2, 40]. The positive correlation between LMA and leaf CC found here is in agreement with a lower investment in structural compounds in shaded leaves.

The Dualex-derived UV absorbance (A_{UV}) increased with irradiance for both species. However, A_{UV} was not correlated to leaf CC in *F. excelsior*. Net balance of biochemical changes accounts for variation in construction cost. Different chemical compositions might result in similar CC, and thus, CC might be almost insensitive to environmental changes even if the biochemical composition of an organ is altered [9, 23, 33]. Leaves with high protein contents often exhibited high mineral contents when compared among species [31, 32, 42]. In this study, there was no relation between nitrogen and ash content, but leaf CC was negatively related to leaf ash content in both species. The low level of variation of leaf CC in *F. excelsior* across light gradients is probably related to the strong negative correlation between A_{UV} and nitrogen content (N). A_{UV} and N are respectively indicative of phenolic and protein contents that are both expensive compounds. This negative correlation between two expensive compounds might have damped variations in construction cost [9].

N increased in leaves of *F. excelsior* with shade whereas it remained almost constant in leaves of *A. platanoides*. Increased leaf N with shade could enhance photosynthetic capacity (per unit leaf mass) but could in turn increase construction costs (and maintenance costs) of leaves, lowering the beneficence in terms of carbon balance [16, 36]. The results would be even more detrimental if NO_3^- was the main source of nitrogen. In addition, high N is thought to increase vulnerability to herbivory, and then, to reduce leaf lifespan and integrated carbon gain [45].

5. CONCLUSIONS

Lower cost associated to leaf area renewal in saplings growing in deep shade counteracts the lower photosynthetic carbon assimilation per unit leaf area in low light conditions. Construction costs associated to leaf area renewal are more affected by shade-induced changes in leaf structure than in tissue chemistry. Lower LMA and, to a lesser extent, larger allocation to

leaves in deep shade than in light shade are morphological plastic responses that reduce shoot CC_A . In addition, a decrease of leaf CC with shade was observed in *A. platanoides* (biochemical plasticity). Ontogenic variations in biochemical composition of plant tissues that induced changes in construction cost have been reported [13, 24]. The cost associated to secondary growth of stem tissues during the following years will have to be considered, especially when changes in light availability occur.

Acknowledgements: The authors thank Catherine Collet and Alexandre Piboule for the access to the experimental site, Jacqueline Marchand and Marie-Laure Toussaint for their help in elemental analysis, Claude Brechet for ^{15}N analysis, Pierre Montpied for his help with hemispheric photography, Erwin Dreyer, Badr Alaoui Sossé, Geneviève Chiapusio and two anonymous reviewers for valuable suggestions and helpful comments. This work was partially supported by the “Réseau de l’Écophysiologie de l’Arbre” (INRA, France).

REFERENCES

- [1] Anderson M.C., Studies of the woodland light climate, I. The photographic computation of light conditions, *J. Ecol.* 52 (1964) 27–41.
- [2] Ashton P.M.S., Berlyn G.P., A comparison of leaf physiology and anatomy of *Quercus* (section *Erythrobalanus* Fagaceae) species in different light environments, *Am. J. Bot.* 81 (1994) 589–597.
- [3] Baruch Z., Goldstein G., Leaf construction costs, nutrient concentration, and net CO_2 assimilation of native and invasive species in Hawaii, *Oecologia* 121 (1999) 183–192.
- [4] Bazzaz F.A., Wayne P.M., Coping with environmental heterogeneity: the physiological ecology of tree seedling regeneration across the gap-understorey continuum, in: Caldwell M.M., Pearcy R.W. (Eds.), *Exploitation of environmental heterogeneity by plants, ecophysiological processes above and below ground: Physiological ecology*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 349–390.
- [5] Boardman N.K., Comparative photosynthesis of sun and shade plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28 (1977) 355–377.
- [6] Canham C.D., Denslow J.S., Platt W.J., Runkle J.R., Spies T.A., White P.S., Light regimes beneath closed canopies and tree fall-gaps in temperate and tropical forest, *Can. J. For. Res.* 20 (1990) 620–631.
- [7] Canham C.D., Software for calculation of light transmission through forest canopies using colour fisheye photography, Institute for Ecosystem Studies, Millbrook, NY, 1995.
- [8] Cartelat A., Cerovic Z.G., Goulas Y., Meyer S., Lelarge C., Prioul J.L., Barbottin A., Jeuffroy M.H., Gate P., Agati G., Moya I., Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Field Crops Res.* 95 (2005) 35–49.
- [9] Chapin F.S.III., The cost of plant structures: evaluation of concepts and currencies, *Am. Nat.* 133 (1989) 1–19.
- [10] Ellsworth D.S., Reich P.B., Canopy structure and vertical patterns of photosynthesis and related leaf traits in a deciduous forest, *Oecologia* 96 (1993) 169–178.
- [11] Frazer G.W., Fournier R.A., Trofymow J.A., Hall R.J., A comparison of digital and film fisheye photography for analysis of forest canopy structure and gap light transmission, *Agr. Forest. Meteorol.* 109 (2001) 249–263.
- [12] Frazer, G.W., Canham, C.D., Lertzman, K.P., Gap Light Analyzer (GLA), Version 2.0: Imaging software to extract canopy structure

- and gap light transmission indices from true-colour fisheye photographs, users manual and program documentation, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, and the Institute of Ecosystem Studies, Millbrook, New York, 1999.
- [13] Gary C., Bertin N., Lebot J., High mineral contents explain the low construction cost of leaves, stem, and fruits of tomato plants, *J. Exp. Bot.* 49 (1998) 49–57.
- [14] Givnish T.J., Adaptation to sun and shade: a whole plant perspective, *Aust. J. Plant Physiol.* 15 (1988) 63–92.
- [15] Goulas Y., Cerovic Z.G., Carlet A., Moya I., Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal UV absorbance by chlorophyll fluorescence, *Appl. Opt.* 43 (2004) 4488–4496.
- [16] Griffin K.I., Thomas R.B., Strain B.R., Effects of nutrient supply and elevated carbon dioxide on construction cost in leaves of *Pinus taeda* seedlings, *Oecologia* 95 (1993) 575–580.
- [17] King D.A., Correlations between biomass allocation, relative growth rate and light environment in tropical forest saplings, *Funct. Ecol.* 5 (1991) 485–492.
- [18] King D.A., Influence of light level on the growth and morphology of saplings in a Panamanian forest, *Am. J. Bot.* 81 (1994) 948–957.
- [19] King D.A., Allocation of above-ground growth is related to light in temperate deciduous saplings, *Funct. Ecol.* 17 (2001) 482–488.
- [20] Laffite H.R., Loomis R.S., Calculation of growth yield, growth respiration, and heat content of grain sorghum from elemental and proximal analysis, *Ann. Bot.* 62 (1988) 353–361.
- [21] Le Roux X., Sinoquet H., Vandame M., Spatial distribution of leaf weight per area and leaf nitrogen content in relation to local radiation regime within an isolated tree crown, *Tree Physiol.* 19 (1999) 181–188.
- [22] McDermitt D.K., Loomis R.S., Elemental composition of biomass and its relation to energy content, growth efficiency, and growth yield, *Ann. Bot.* 48 (1981) 275–290.
- [23] Martinez F., Lazo Y.O., Fernandez-Galiano R.M., Merino J.A., Chemical composition and construction cost of roots of Mediterranean trees, shrub species and grassland communities, *Plant Cell Environ.* 25 (2002) 601–608.
- [24] Merino J.A., Field C.B., Mooney H.A., Construction and maintenance costs of Mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. II. Biochemical pathway analysis, *Oecol. Plant.* 5 (1984) 211–229.
- [25] Messier C., Doucet R., Ruel J.C., Claveau Y., Kelly C., Lechowicz M.J., Functional ecology of advance regeneration in relation to light in Boreal forests, *Can. J. For. Res.* 29 (1999) 812–823.
- [26] Niinemets Ü., Are compound-leaved woody species inherently shade-intolerant? An analysis of species ecological requirements and foliar support costs, *Plant Ecol.* 134 (1998) 1–11.
- [27] Niinemets Ü., Kull O., Biomass investment in leaf lamina versus lamina support in relation to growth irradiance and leaf size in temperate deciduous trees, *Tree Physiol.* 19 (1999) 349–358.
- [28] Niinemets Ü., Valladares F., Ceulemans R., Leaf-level phenotypic variability and plasticity of invasive *Rhododendron ponticum* and non-invasive *Ilex aquifolium* co-occurring at two contrasting European sites, *Plant Cell Environ.* 26 (2003) 941–956.
- [29] Percy R.W., Sims D.A., Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant, in: Caldwell M.M., Percy R.W. (Eds.), *Exploitation of environmental heterogeneity by plants, ecophysiological processes above and below ground: Physiological Ecology*, Academic press, San Diego, 1994, pp. 145–174.
- [30] Poorter H., Construction costs and payback time of biomass: a whole-plant perspective, in: Roy J., Garnier E. (Eds.), *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*, S.P.B Academic Publishing, The Hague, 1994, pp. 111–127.
- [31] Poorter H., Bergkotte M., Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate, *Plant Cell Environ.* 15 (1992) 2211–2229.
- [32] Poorter H., De Jong R., A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity, *New Phytol.* 143 (1999) 163–176.
- [33] Poorter H., Villar R., The fate of acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs, in: Bazzaz F.A., Grace J. (Eds.), *Plant resource allocation*, Academic Press, San Diego, 1997, pp. 39–72.
- [34] Poorter L., Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species, *Funct. Ecol.* 15 (2001) 113–123.
- [35] Rameau J.C., Mansion M., Dumé G., *Flore forestière française, guide écologique illustré, Tome 1 : Plaines et collines*, Institut pour le développement forestier, Paris, 1993.
- [36] Reich P.B., Walters M.B., Ellsworth D.S., Vose J., Volin J., Gresham C., Bowman W., Relationships of leaf dark respiration to leaf N, SLA, and life span: a test across biomes and functional groups, *Oecologia* 114 (1998) 471–482.
- [37] Roggy J.C., Nicolini E., Imbert P., Caraglio Y., Bosc A., Heuret P., Links between tree structure and functional leaf traits in the tropical forest tree *Dicorynia guianensis* Amshoff (Caesalpinaceae), *Ann. For. Sci.* 62 (2005) 553–564.
- [38] Sims D.A., Percy R.W., Scaling sun and shade photosynthetic acclimation of *Alocasia macrorrhiza* to whole-plant performance. I. Carbon balance and allocation at different daily photon flux densities, *Plant Cell Environ.* 17 (1994) 881–887.
- [39] Sobrado M.A., Cost-benefit relationships in deciduous and evergreen leaves of tropical dry forest species, *Funct. Ecol.* (1991) 608–616.
- [40] Valladares F., Skillman J.B., Percy R.W., Convergence in light capture efficiencies among tropical forest shade tolerant plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation, *Am. J. Bot.* 89 (2002) 1275–1284.
- [41] Vertregt N., Penning de Vries F.W.T., A rapid method for determining the efficiency of biosynthesis of plant biomass, *J. Theor. Biol.* 128 (1987) 109–119.
- [42] Villar R., Merino J., Comparison of leaf construction costs of woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems, *New Phytol.* 151 (2001) 213–226.
- [43] Williams K., Field C.B., Mooney H.A., Relationships among leaf construction cost, leaf longevity, and light environment in rain-forest plants of the Genus *Piper*, *Am. Nat.* 133 (1989) 198–211.
- [44] Williams K., Percival F., Merino J., Mooney H.A., Estimation of tissue construction cost from heat of combustion and organic nitrogen content, *Plant Cell Environ.* 10 (1987) 725–734.
- [45] Wright I.J., Reich P.B., Westoby M., Ackerly D.D., Baruch Z., Bongers F., Cavender-Bares J., Chapin T., Cornelissen J.H.C., Diemer M., Flexas J., Garnier E., Groom P.K., Gulias J., Hikosaka K., Lamont B.B., Lee T., Lee W., Lusk C., Midgley J.J., Navas M.L., Niinemets U., Oleksyn J., Osada N., Poorter H., Poot P., Prior L., Pyankov V.I., Roumet C., Thomas S.C., Tjoelker M.G., Veneklaas E.J., Villar R., The worldwide leaf economics spectrum, *Nature* 428 (2004) 821–827.

Annexe B: Article soumis à Journal of Experimental Botany.

Sandrine Barthod, Zoran Cerovic et Daniel Epron , Can dual chlorophyll fluorescence excitation be used to assess the variation in the content of UV absorbing phenolics compounds in leaves of temperate tree species along a light gradient?



RESEARCH PAPER

Can dual chlorophyll fluorescence excitation be used to assess the variation in the content of UV-absorbing phenolic compounds in leaves of temperate tree species along a light gradient?

Sandrine Barthod¹, Zoran Cerovic² and Daniel Epron^{3,*}¹ Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biologie Environnementale, Pôle de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, F-25 211 Montbéliard Cedex, France² Equipe de Biospectroscopie Végétale, Département d'Écophysologie Végétale, Laboratoire d'Ecologie Systémique et Evolution, Université de Paris Sud, Bâtiment 362, F-91405 Orsay Cedex, France³ Nancy University, Université Henri Poincaré, UMR 1137 INRA–UHP Ecologie et Ecophysologie Forestières, BP 239, F-54506 Vandœuvre Cedex, France

Received 22 September 2006; Revised 20 January 2007; Accepted 30 January 2007

Abstract

The present study assesses light-induced variations in phenolic compounds in leaves of saplings of two co-occurring temperate species (*Acer platanoides* L., and *Fraxinus excelsior* L.) along a light gradient using a new non-invasive optical method (Dualex). The Dualex-derived UV absorbance of leaf epidermis (the sum of the adaxial and abaxial faces, A_{UV}) increased significantly with increasing light in both species. A_{UV} values were correlated with absorbance of the leaf extract at 305 nm and 375 nm (A_{305} and A_{375}) in both species with similar slopes for both species. However, a large difference in intercept was observed between the two species when A_{305} was regressed against A_{UV} . Similarly, A_{UV} values were well correlated with the amount of phenolics in the leaf extracts assessed by the Folin–Ciocalteu method, but slopes were significantly different for the two species. Thus, the UV-A epidermal transmittance, despite being a reliable indicator of the UV-screening capacity of the leaf epidermis, cannot be used for any quantitative estimate of UV-B screening capacity or of energetic requirement for leaf construction without a species-specific calibration.

Key words: *Acer platanoides* L., epidermis, fluorescence, *Fraxinus excelsior* L., phenolic compounds, UV absorbance, shade.

Introduction

Plants produce a diverse array of phenolics, ranging from simple molecules such as phenolic acids to large highly polymerized compounds such as tannins and other polyphenolics. They play several important roles in plants and any change in plant chemistry may have a large influence on ecosystem functions; like trophic interaction in food webs, outcome of competition between plant species, or nutrient cycling (Baas *et al.*, 1989; Harborne and Williams, 2000; Ballaré *et al.*, 2001; Rousseaux *et al.*, 2004). Some phenolics serve as defence against herbivory, pathogens, or ultraviolet (UV) radiation, while others are important attractants for pollinators and seed dispersers or exhibit allelopathic activity (Harborne, 1989; Bornman *et al.*, 1997; Cockell and Knowland, 1999; Ballaré *et al.*, 2001). Flavonoids and hydroxycinnamic acid conjugates are the most efficient UV-screening compounds because of their strong absorbance in this wavelength region (Caldwell *et al.*, 1995; Cockell and Knowland, 1999). Their concentrations in epidermal layers are significantly increased by UV radiation (Burchard *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2001).

The synthesis of phenolics uses a lot of energy (on average 2.6 g glucose g^{-1} phenolics; Poorter and Villar, 1997). Thus, a large investment in phenolic compounds may affect the plant's growth and vitality despite the advantages they provide. Phenotypic plasticity will enable plants to match their phenolic contents with the

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: daniel.epron@scbiol.uhp-nancy.fr

environmental conditions. This is particularly important in a light gradient where the photoprotective involvement of phenolics decreases with increasing shade while the energetic cost of their synthesis becomes more disadvantageous for the plant carbon balance.

Commonly used techniques for quantifying the amount of UV-absorbing compounds include quantification of phenolic compounds in leaf extracts using spectrophotometry, chromatography, and other techniques (Veit *et al.*, 1995; Appel *et al.*, 2001), measurements of the spectral transmittance of epidermal peels using an integrating sphere (Flint *et al.*, 1985), or direct measurements of the UV levels inside the leaf using fibre optic microprobes (Day *et al.*, 1994). All of these methods have distinct advantages and limitations. Two specific problems with methods using leaf extracts are that compounds of interest may be insoluble and that compounds located within the mesophyll do not protect the leaf against UV radiations. Another problem that is common to all methods is that they are time-consuming and, therefore, have limited applications in field studies that require multiple and rapid comparisons among genotypes or among plants subjected to contrasting environments.

Recently, methods using chlorophyll fluorescence have been developed to assess the UV-absorbing properties of leaves. The ratio of chlorophyll fluorescence induced by UV radiation and by visible radiation is well related to the transmittance of the epidermis in the UV region (Bilger *et al.*, 1997, 2001; Barnes *et al.*, 2000; Burchard *et al.*, 2000; Markstädter *et al.*, 2001; Cerovic *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 2003). A large part of the UV radiation is absorbed in the epidermis, depending on the relative amount of UV-absorbing substances, while visible radiation reaches the chloroplasts largely undiminished. Accumulation of UV-absorbing compounds in the epidermis will reduce the fluorescence excited by the UV beam, without affecting the fluorescence excited by the visible beam. These non-invasive methods have the great advantage of estimating UV penetration without introducing any perturbation in the optical properties of the leaves, and using natural UV target (chlorophyll) as a reporter of the UV climate within the mesophyll. Dualex (dual excitation of chlorophyll fluorescence) is a portable leaf-clip device that allows non-destructive estimation of the absorbance by the leaf epidermis using two excitation wavelengths, one in the UV part of the spectrum at 375 nm (epidermal UV-A shielding), and one red reference wavelength at 650 nm that crosses the epidermis without being absorbed before reaching the chlorophyll in the mesophyll (Ounis *et al.*, 2001; Goulas *et al.*, 2004).

The objectives of the present study were (i) to assess the light-induced variations in phenolic compounds in leaves of saplings of two temperate species (*Acer platanoides* L., and *Fraxinus excelsior* L.) along a light gradient using this new non-invasive optical method, (ii) to check whether

the epidermal UV absorbance of leaves obtained using the Dualex were related to the UV absorbance of the total leaf methanolic extract and to the soluble phenolic contents obtained by a colorimetric method based on their reducing properties (Folin–Ciocalteu), and (iii) to test whether these relations were species-specific or more generic.

Materials and methods

Site description

The study was carried out in a naturally regenerated temperate forest (Graouilly Forest, Moselle, France, 49°05' N, 6°02' E, 300 m elevation (Barthod and Epron, 2005). The overstorey is dominated by *Acer pseudoplatanus* L. and *Fagus sylvatica* L. In addition to these two species, understorey vegetation is composed of saplings of *Sorbus torminalis* L.; *Sorbus aria* L.; *Acer campestre* L.; *Acer platanoides* L.; *Ulmus glabra*; *Fraxinus excelsior* L. and *Tilia cordata*. Monthly average air temperature ranged between 1.6 °C in January and 18.7 °C in July and total annual rainfall was 745 mm (data from Météo France, Metz-Augny 1946–2001 periods).

Estimation of irradiance conditions

Hemispherical photographs were taken above each sapling with a digital camera (Coolpix 4500, Nikon, Japan) equipped with a fisheye converter (FC-E8, Nikon) as already described in Barthod and Epron (2005). The hemispheric photographs (3.9 millions pixels) were analysed using Gap Light Analyser software (GLA V2.0, Institute of Ecosystem Studies, New York, USA; Canham *et al.*, 1990; Pacala *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 2001). The threshold for calculating canopy openness was manually fixed using pixel histograms (lowest frequency value) and visually checked. Potential diffuse (standard overcast) and direct photosynthetic active radiation transmitted through the canopy above each sapling was calculated from canopy openness and expressed relative to incoming radiation above the canopy (T_{dif} and T_{dir} , respectively). Sky regions were defined from eight azimuth classes and 20 zenith classes and the solar time step was set to 2 min. The Global Site Factor ($GSF = (T_{dif} + T_{dir})/2$) was calculated assuming an equal proportion of diffuse and direct radiation above the canopy (Anderson, 1964; Canham *et al.*, 1990). GSF values were averaged over a period starting on 1 May and ending on 31 August.

Sampling and analysis

Twenty-four saplings (0.5–1.0 m high) of *Acer platanoides* L. and of *Fraxinus excelsior* L. were sampled in the stand in a large range of light environments in August 2003.

The aerial part of each plant was harvested, stored in an icebox, and transferred to a fridge (4 °C). At the earliest opportunity (within 24 h) 10–20 leaves from each sapling were sampled and their Dualex absorbance was immediately recorded (see following paragraph). Leaf area was measured with a leaf area portable meter (LI-3000A, Li-Cor, Nebraska, USA). Leaf dry mass was estimated after freeze-drying and specific leaf area of leaves was calculated as the ratio between leaf area and leaf dry mass. All samples were ground to a fine powder and stored dry until analysis.

Optical measurements of epidermal UV absorbance

A dual excitation fluorimeter (Dualex® Dual Excitation, prototype CNRS-LURE, France) was used for the non-destructive assessment of phenolics present in leaf epidermis (Goulas *et al.*, 2004; Cartelat *et al.*, 2005). Briefly, the measurement of leaf epidermal absorbance

of UV light is based on the screening effect of the epidermis that absorbs part of the incident UV light and therefore decreases the amount of light available for chlorophyll fluorescence excitation. An incident red light is used as a reference for chlorophyll fluorescence as the leaf epidermis is almost transparent in this spectral region. The leaf is alternately illuminated by UV (375 nm) and red (655 nm) light-emitting diodes (LED) at a modulation frequency of 1 kHz. For a constant UV-LED intensity, epidermal transmittance in the UV is equal to the reference red LED intensity when it is adjusted to induce the same chlorophyll fluorescence as the UV LED, thanks to an electronic feed-back loop. Absorbance was defined as the base-10 logarithm of the transmittance reciprocal (Goulas *et al.*, 2004). Absorbance values displayed on the Dualex after 1 s were recorded for the lamina of 10–20 fully-developed leaves of each plant which had no noticeable insect or mechanical damage. Depending on the leaf area, one or two measurements were taken first on the adaxial (upper) and then on the abaxial (lower) side of each leaf. Values for the adaxial and abaxial leaf side were averaged for each sapling. Dualex readings of the adaxial and abaxial were summed to provide an area-based estimate of total UV absorbance (A_{UV}) of the leaf epidermis (Goulas *et al.*, 2004; Cartelat *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2006).

Extraction of phenolic compounds

A 100 mg aliquot of the homogenized leaf sample was extracted twice with 9 ml of a mixture containing methanol and chloroform (2/2, v/v) according to Bligh and Dyer (1959). Samples were vortexed and kept at room temperature for 30 min to allow for complete solvent extraction. The addition of water into the methanol/chloroform mixture (1/2/2: by vol.) produces a chloroform phase which contains chlorophylls and carotenoids, and a methanol/water phase on the top devoid of chlorophyll and carotenoids, which contains the soluble phenolic compounds. The methanol/water phase was collected with a Pasteur pipette and filtered through syringe filters (Interchrom, PVDF: polyvinylidene difluoride, pores size 0.45 μm) and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Extractions were repeated for each sapling to duplicate the reading.

Quantification of phenolic compounds

Total soluble phenolics content was measured using the Folin–Ciocalteu assay (Singleton and Rossi, 1965). Briefly, 50 μl of sample and 475 μl of 0.25 N Folin–Ciocalteu reagent were mixed and kept at room temperature for 5 min. Next, 475 μl of a 7% sodium carbonate solution were added and the mixture was kept at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Detection of phenolic compounds was performed at 724 nm, using a Beckman DU 640B spectrophotometer. Phenolic content was standardized against coumaric acid. The standard curve was linear from 0 to 250 g l^{-1} giving an absorbance range of 0.05–0.80 ($R^2=0.998$). Total soluble phenolics content (*PHE*) was expressed on a leaf area basis knowing the specific leaf area of leaves.

Absorbance spectra (250–400 nm)

Absorbance of 10-fold-diluted leaf extracts were scanned from 250 nm to 400 nm (Beckman DU 640B spectrophotometer). All absorbance values of extracts were recalculated taking into account the dilution and the specific leaf area of leaves to make them equivalent to Dualex surface-based measurements. UV-absorbance values at 305 nm and 375 nm (A_{305} and A_{375}) were further used as relative measures of soluble phenolic compounds absorbing in the UV-B and UV-A spectral region, respectively.

Statistical analyses

Linear regression analyses were performed using JMP® version 3.2 (SAS Institute Inc, SAS campus Drive Cary, IN 27513) to examine

the relationship between *GSF*, A_{UV} , A_{305} , A_{375} , and *PHE*. Regression coefficients were calculated and tested for significant deviation from zero ($P < 0.05$). Differences between slope values or between intercept values were not significant when 95% confidence intervals overlapped. Intercept values and slopes values were also tested for significant deviation from, respectively, zero and 1 ($P < 0.05$).

Results

Changes in UV absorbance and composition of phenolics in a light gradient

Saplings of both species were sampled within the same light gradient, with global site factor values (*GSF*) ranging between 6% and 52%. Unfortunately, intermediate values of *GSF* (20–40%) were underrepresented for both species.

Dualex values were first compared between the adaxial side and the abaxial side for each leaf (Fig. 1). For the two temperate species, Dualex values of the two sides of leaves are highly correlated ($R^2=0.89$ for *F. excelsior* and $R^2=0.76$ for *A. platanoides*). Adaxial values were three time higher than those in abaxial epidermis for both species. The Dualex-derived UV absorbance of leaf epidermis (the sum of the adaxial and abaxial faces, A_{UV}) increased significantly with increasing light in both species ($R^2=0.81$ and $R^2=0.66$, for *F. excelsior* and *A. platanoides*, respectively; Fig. 2A). The slope of *F. excelsior* is significantly steeper than that of the other species.

Absorbance of the leaf extract (A_{305} and A_{375}) increased significantly with increasing light in both species (Fig. 2B, C) but the correlation with *GSF* was much better for *F. excelsior* ($R^2=0.78$ and 0.79) than for *A. platanoides* ($R^2=0.43$ and 0.62). The slopes were significantly different between species for A_{375} in agreement with the Dualex data, but not for A_{305} .

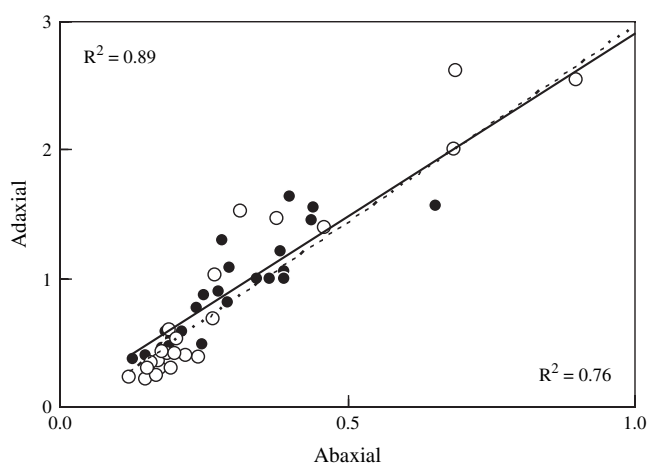


Fig. 1. Relationship between Dualex-derived UV absorbance of the abaxial and adaxial sides of leaves of *A. platanoides* (closed symbols) and of *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (r^2) and linear regression lines (solid line for *A. platanoides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($P < 0.05$).

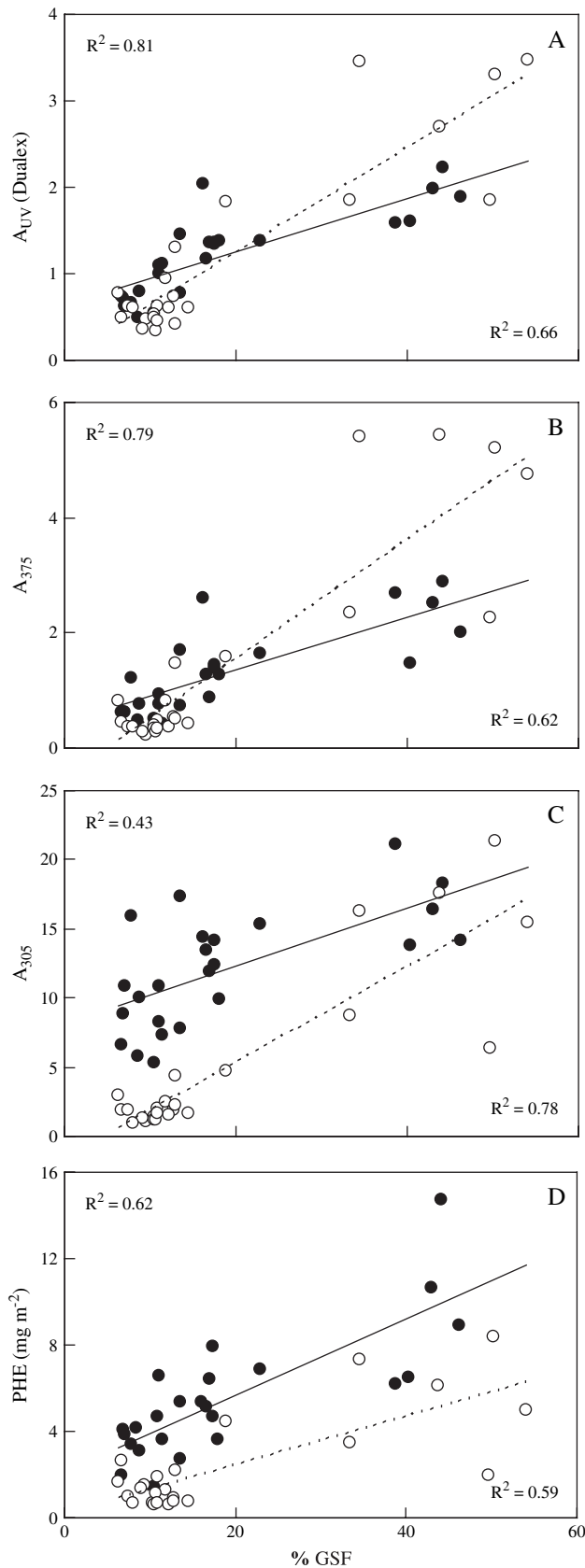


Fig. 2. Relationships between irradiance (global site factor, *GSF*) and absorbance of leaf extract at 375 nm (A_{375} , B) and 305 nm (A_{305} , C),

Content of soluble phenolic compounds (measured with the Folin–Ciocalteu method) also increased significantly with increasing light in both species ($R^2=0.59$ for *F. excelsior* and $R^2=0.62$ for *A. platanoides*, Fig. 2D). Slopes were not significantly different. For a given light environment, leaves of *A. platanoides* contain more phenolic compounds per unit of leaf area than those of *F. excelsior*. 275

Correlation between epidermal UV absorbance, UV absorbance of leaf extract, and composition of phenolics 280

A_{UV} values were highly correlated with A_{375} in both species (Fig. 3A; $R^2=0.95$ for *F. excelsior* and $R^2=0.79$ for *A. platanoides*). The root mean square error was also lower for *F. excelsior* (0.35) than for *A. platanoides* (0.42). Slopes were not significantly different from each other, but both were significantly higher than one, with 95% confidence intervals of [1.51, 1.86] for *F. excelsior* and [1.05, 1.66] for *A. platanoides*. The y-intercept was significantly negative for *F. excelsior* while it was negative but not different from zero for *A. platanoides* ($P=0.08$). 285 290

A_{UV} values were also well correlated with A_{305} for *F. excelsior* ($R^2=0.91$) but correlation was weaker for *A. platanoides* ($R^2=0.52$; Fig. 3B). The root mean square error was again lower for *F. excelsior* (1.85) than for *A. platanoides* (2.97). Slopes were not significantly different from each other, but were 3–4 times higher than with A_{375} because of the higher absorbance of leaf extracts in the UV-B region than in the UV-A region (Fig. 4). The y-intercept was significantly positive for *A. platanoides* while it was significantly negative for *F. excelsior*. The positive intercept on the A_{305} indicates that the extract contained UV-B absorbers coming from the mesophyll that do not vary with A_{UV} *in vivo*, which is restricted to epidermal absorbance. 295 300 305

A_{UV} values were highly correlated with the content of phenolic compounds in the leaf extract (Fig. 3C; $R^2=0.85$ and $R^2=0.65$, for *F. excelsior* and *A. platanoides*, respectively). Slopes were significantly different from each other and the root mean square error was lower for *F. excelsior* (0.86) than for *A. platanoides* (1.73). 310 315

UV absorbance spectra of leaves of sun and shade saplings

An average spectrum (250–400 nm) of leaf extract of three saplings growing in shade ($GSF < 10\%$, full points) and an average spectrum of leaf extract of three saplings 315

Dualex-derived UV absorbance (the sum of the abaxial and adaxial sides values, A_{UV} , A) and leaf phenolics content (PHE, D) for *A. platanoides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (R^2) and linear regression lines (solid line for *A. platanoides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($P < 0.05$).

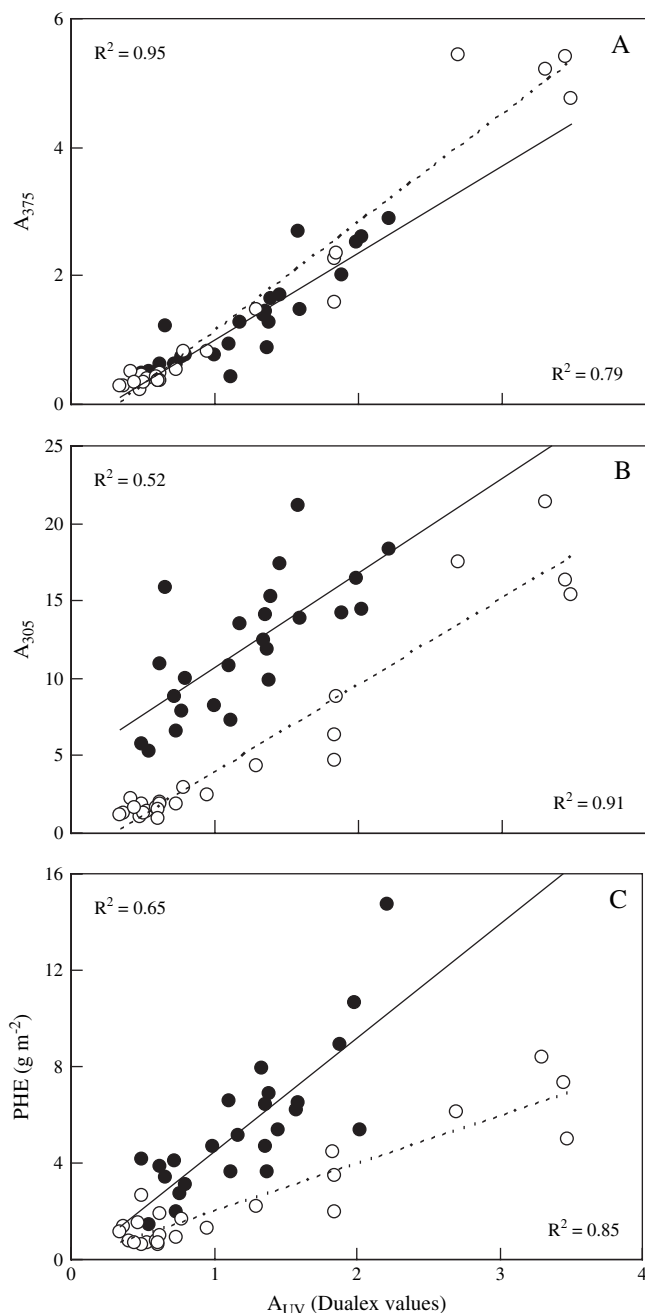


Fig. 3. Relationships between Dualex derived UV absorbance (sum of the abaxial and adaxial sides values, A_{UV}) and absorbance of leaf extract at 375 nm (A_{375} , A) and 305 nm (A_{305} , B), and leaf phenolics content (PHE, C) for *A. platanoides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Determination coefficients (R^2) and linear regression lines (solid line for *A. platanoides* and dotted line for *F. excelsior*) are given when significant ($P < 0.05$).

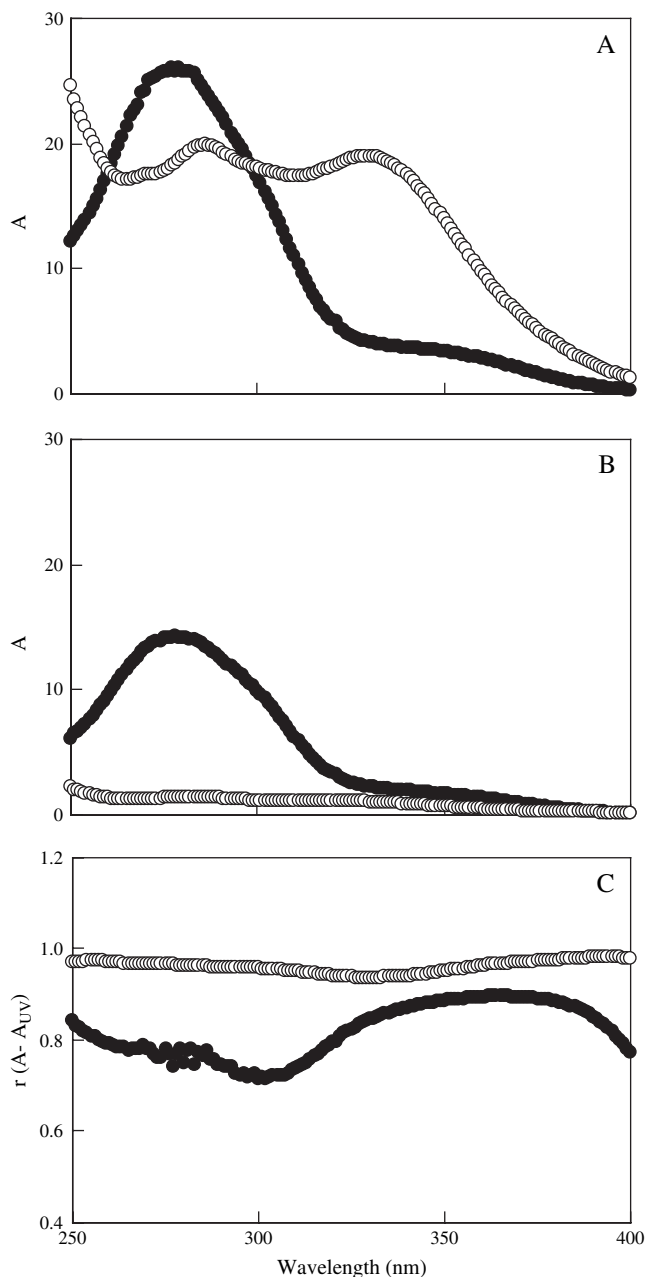


Fig. 4. Absorbance spectra in the UV spectral region of methanolic extracts sun leaves (A) and shade leaves (B) for *A. platanoides* (closed symbols) and *F. excelsior* (open symbols). Spectra of five saplings were averaged for each group. Correlation coefficients (r , C) between absorbance of methanolic extracts and Dualex-derived UV absorbance [sum of the abaxial and adaxial sides values, A_{UV} for *A. platanoides* (closed symbols, $n=24$) and *F. excelsior* (open symbols, $n=24$)].

growing in more open conditions ($GSF > 40\%$, open points) were computed for each species, and were plotted in Fig. 4A for sun leaves and in Fig. 4B for shade leaves. For both species, spectra of sun leaves showed a higher content of UV-absorbing compounds than those of shade leaves. Spectra of sun-exposed *F. excelsior* L. exhibited

high absorbance at all wavelengths with two distinguishable maxima at 286 nm and 329 nm. The absorbance spectra of *A. platanoides* exhibited a broad band with a maximum at 279 nm and most of the difference between spectra of sun and shade saplings ranged around this maximum. For *Acer platanoides* L. half of the spectrum amplitude, i.e. half of the UV-B absorbers contained in

the leaf extract, was already present in leaves of shade
 330 saplings. Correlation coefficients between A_{UV} and absor-
 bance of the leaf extract at each wavelength (between 250
 nm and 400 nm) are reported in Fig. 4C. A_{UV} values were
 well correlated with the absorbance of the leaf extract for
 335 *F. excelsior* at all wavelengths (R ranging between 0.94
 and 0.98; Fig. 4C) while correlation was weaker for *A.*
platanoides at all wavelengths, but especially in the UV-B
 spectral region.

Discussion

The level of sun irradiance, as estimated from the GSF
 340 values, influenced leaf absorbance in the UV region of
 field-grown saplings of *A. platanoides* and *F. excelsior*.
 Increase in sun irradiance enhanced the UV-screening
 capacity of the leaf epidermis as already reported (Krause
et al., 2003; Goulas *et al.*, 2004). The light-induced varia-
 345 tion was more pronounced in *F. excelsior* leaves than in
A. platanoides leaves, but in the shade, leaves of *A.*
platanoides contained higher amounts of UV-absorbing
 compounds than leaves of *F. excelsior*. The accumulation
 of UV-absorbing compounds in the epidermal cells is
 350 thought to protect the mesophyll cells and the photosyn-
 thetic apparatus against UV-induced damage (Mazza *et al.*,
 2000; Kolb *et al.*, 2001) and shade leaves are probably
 more prone to UV stress when exposed to full sunlight,
 even during short periods of time (Krause *et al.*, 2003).
 355 The biosynthesis and accumulation of flavonoids, hydrox-
 ycinnamic acids, and other related phenylpropanoid com-
 pounds are among the most commonly reported responses
 of plants to UV-B radiation (Caldwell *et al.*, 1995; Cockell
 and Knowland, 1999). The adaxial UV-absorbance was
 360 three times higher than the corresponding abaxial value
 for both species. Similar results have been reported on
 many species (Bilger *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2000;
 Markstädter *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2003; Kolb and
 Pfündel, 2005) and, in this case, the difference between the
 365 two sides of the leaves was probably related to the hori-
 zontal foliage orientation of these species, with adaxial
 surfaces receiving a greater amount of UV radiation than
 abaxial surfaces. As already pointed out, UV-absorbing
 substances are particularly protective when they are
 370 accumulated in the adaxial epidermis of planophile leaves
 (Markstädter *et al.*, 2001) while opposite results or less
 pronounced differences between both sides were reported
 for plants with more erect leaves (Burchard *et al.*, 2000;
 Barnes *et al.*, 2000; Kolb and Pfündel, 2005).

375 Dualex readings were in accordance with the absor-
 bance at 375 nm of the leaf extract. This result was ex-
 pected since measurements of Dualex are based on the
 excitation at 375 nm (Goulas *et al.*, 2004) and the linear
 relationships observed in this study contrasted with the
 380 curvilinear relationship reported by others (Kolb *et al.*,

2001; Kolb and Pfündel, 2005). For the two species, the
 negative intercept can be explained by the presence of
 UV-absorbing compounds in the epidermal cells that are
 not extractable by methanol (Ounis *et al.*, 2001). The
 385 slopes of the linear regression between A_{UV} and A_{375} were
 similar between the two species, demonstrating that the
 non-invasive technique of the Dualex system provides a
 useful assessment of leaf protection against solar UV-A
 radiation (at 375 nm). However, the slopes were slightly
 390 higher than 1 for both species, suggesting that additional
 phenolics are present in mesophyll and vascular tissues of
 leaves and contribute to the additional A_{375} extract (Barnes
et al., 2000; Kolb *et al.*, 2001; Kolb and Pfündel, 2005).
 Dualex senses only epidermal UV-absorbers whereas the
 extracts are obtained from the entire leaf. Therefore, the
 395 absorbance values (per unit leaf surface) in extracts are
 larger than the corresponding Dualex measurement.

The slopes were much higher when A_{UV} was regressed
 again A_{305} . This was expected since most of the UV-
 400 absorbing compounds have a much greater absorption in
 the UV-B region than in the UV-A. This is well illustrat-
 ed by the absorbance spectra of the leaf extracts. A_{305} values
 were higher than A_{375} values, as already reported (Krause
et al., 2003). Differences between spectra obtained on the
 405 two species highlighted that different classes of phenolics
 are involved in light-induced variation in UV absorbance,
 in agreement with the observed difference in slopes of A_{UV}
 versus A_{305} relations. Sun leaves of *F. excelsior* seem to
 accumulate both UV-B and UV-A screening compounds;
 410 whereas *A. platanoides* accumulate only UV-B protective
 compounds. This difference between the two species is
 similar to the one found between woody and herbaceous
 plants, the latter tending to accumulate flavones (Day *et al.*,
 1994). The nature of the phenolic compounds involved in
 415 UV protection in our two species has not been identified.
 The absorbance spectra of sun leaves of both species
 showed a broad band with a maximum around 270 nm and
 290 nm which may correspond to simple phenols, phenolic
 acids, some flavonoids (isoflavones, flavanones), or antho-
 420 cyanins that have only a weak absorbance in the UV-A
 region while *F. excelsior* exhibited a second broad band
 with a peak around 320 nm and 340 nm, corresponding to
 other flavonoids like flavone or hydroxycinnamic acids that
 absorb in both spectral regions (see Cerovic *et al.*, 2002,
 425 for a compilation of spectral regions of absorption maxima
 of major classes of phenolics). The difference in phenolic
 composition between both species probably explained the
 high positive intercept observed for *A. platanoides* and
 the negative one for *F. excelsior* when A_{305} is regressed
 430 against A_{UV} . In addition, the absorption spectrum of the
 extract containing total leaf-extractable constituents might
 not be representative of epidermal constituents. This large
 difference between the two species highlighted that the
 UV-A epidermal transmittance is not a reliable quantitative
 435 indicator of the total UV screening capacity of the leaf

epidermis, despite the fact that most of UV-B absorbing compounds also absorbed in the UV-A region. Other studies exist which disagree with (Barnes *et al.*, 2000) or corroborate (Krause *et al.*, 2003) this finding.

440 Total leaf phenolics are often assessed using the Folin-type colorimetric method that is based on the reducing properties of phenolic compounds, especially for the study of herbivore protection, energetic cost of defence investment, or decomposition (Appel *et al.*, 2001). These
445 methods have been applied when the light-induced changes in these ecological properties are analysed within a canopy or across a light gradient (Cronin and Lodge, 2003; Covelo and Gallardo., 2004; Chacon and Armesto, 2006; Poorter *et al.*, 2006). But as far as we are aware,
450 the relationship between changes in phenolic content as assessed by Folin-type methods (PHE) and changes in epidermal UV absorbance has never been studied. In the present work it was found that A_{UV} was correlated with PHE, but that the slopes are significantly different
455 between the two species. Nevertheless, non-destructive *in vivo* measurements (Dualex) are better indicators of the light regime (*GSF*) than either the Folin-type method or the extract-absorbance method.

Conclusion

460 The most important finding of this study was the good correlation between soluble phenolics in methanolic extracts (determined by absorbance in the UV-A, in the UV-B, and with the Folin–Ciocalteu method) and the optical measurement of epidermal UV absorbance of leaves of
465 *A. platanoides* and of *F. excelsior*. However, since the intercepts differ markedly between species when relating A_{UV} with the absorbance in the UV-B region of the leaf extract or with the amount of phenolics in the leaf extracts assessed by the Folin–Ciocalteu method, any quantitative
470 estimate of UV-B screening capacity or energetic requirement for leaf construction would need a species-specific calibration.

Acknowledgements

475 The authors thank Yves Goulas (CNRS) for lending a Dualex prototype and Gisèle Libawo for her help in laboratory analysis. This work was supported by the CNRS through the GDR 1536 ‘FLUOVEG’.

References

- 480 **Anderson MC.** 1964. Light relations of plants communities. *Biological Review* **39**, 425–486.
- Appel HM, Governor HL, D’Ascenzo M, Siska E, Schultz JC.** 2001. Limitations of the Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of Chemical Ecology* **27**, 761–778.
- 485 **Ballaré CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Robson MT, Caldwell MM, Sala OE, Scopel AL.** 2001. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): an overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **62**, 67–77.
- Barnes PW, Searles PS, Ballaré CL, Ryel RJ, Caldwell MM.** 490 2000. Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum* **109**, 274–283.
- Barthod S, Epron D.** 2005. Variations of construction cost associated to leaf area renewal in saplings of two co-occurring
495 temperate tree species (*Acer platanoides* L. and *Fraxinus excelsior* L.) along a light gradient. *Annals of Forest Science* **62**, 545–551.
- Bass WJ.** 1989. Secondary plant compounds, their ecological significance and consequences for the carbon budget. Introduction of the Carbon/Nutrient Cycle theory. In: Lambers H, Cambridge
500 ML, Konigs H, Pons TL, eds. *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, 313–340.
- Bilger W, Johnsen T, Schreiber U.** 2001. UV-excited chlorophyll
505 fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2007–2017.
- Bilger W, Veit M, Schreiber L, Schreiber U.** 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll
510 fluorescence. *Physiologia Plantarum* **101**, 754–763.
- Bligh EG, Dyer WJ.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911–917.
- Bornman JF, Reuber S, Cen Y-P, Weissenböck G.** 1997. 515 Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In: Lumsden J, ed. *Plants and UV-B: responses to environmental change*. Cambridge, NY: Cambridge University Press, 157–168.
- Burchard P, Bilger W, Weissenböck G.** 2000. Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of
520 UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1373–1380.
- Caldwell MM, Teramura AH, Tevini M, Bornmann JF, Björn LO, Kulandaivelu G.** 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio* **24**, 166–173.
- Canham CD, Denslow JS, Platt WJ, Runkle JR, Spies TA, White PS.** 1990. Light regimes beneath closed canopies and tree-fall gaps in temperate and tropical forests. *Canadian Journal of
530 Forest Research* **20**, 620–631.
- Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, et al.** 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* **91**, 35–49. 535
- Cerovic ZG, Ounis A, Cartelat A, Latouche G, Goulas Y, Meyer S, Moya I.** 2002. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of
540 UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1663–1676.
- Chacón P, Armesto JJ.** 2006. Do carbon-based defences reduce foliar damage? Habitat-related effects on tree seedling performance in a temperate rainforest of Chiloé Island, Chile. *Oecologia* **16**, 555–565.
- Cockell CS, Knowland J.** 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Review, Cambridge Philosophical Society* **74**, 311–345. 545
- Covelo F, Gallardo A.** 2004. Green and senescent leaf phenolics showed spatial autocorrelation in a *Quercus robur* population in northwestern Spain. *Plant and Soil* **359**, 267–276. 550

- Cronin G, Lodge DM.** 2003. Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia* **137**, 32–41.
- 555 **Day TA, Howells BW, Rice WJ.** 1994. Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. *Physiologia Plantarum* **92**, 207–218.
- Flint SD, Jordan PW, Caldwell MM.** 1985. Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: leaf 560 optical properties and photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* **41**, 95–99.
- Fraser GW, Fournier RA, Trofymow JA, Hall RJ.** 2001. A comparison of digital and film fisheye photography for analysis of forest canopy structure and gap light transmission. *Agricultural and Forest Meteorology* **109**, 249–263.
- 565 **Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I.** 2004. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics* **43**, 4488–4496.
- 570 **Harborne JB.** 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1. *Plant phenolics*. Academic Press, 1–28.
- Harborne JB, Williams CA.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504.
- 575 **Kolb C, Käser MA, Kopecky J, Zotz G, Reiderer M, Pfündel EE.** 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* **127**, 863–875.
- Kolb CA, Pfündel EE.** 2005. Origins of non-linear and dissimilar 580 relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant, Cell and Environment* **25**, 580–590.
- Krause GH, Gallé A, Gademann R, Winter K.** 2003. Capacity of protection against ultraviolet radiation in sun and shade leaves 585 of tropical forest plants. *Functional Plants Biology* **30**, 533–542.
- Markstädter C, Queck I, Baumeister J, Riederer M, Schreiber U, Bilger W.** 2001. Epidermal transmittance of leaves of *Vicia faba* UV radiation as determined by two different methods. *Photosynthesis Research* **67**, 17–25.
- Mazza CA, Boccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL.** 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* **122**, 117–125. 590
- Meyer S, Cerovic ZG, Montpied P, Demotes-Mainard S, Bidel LPR, Moya I, Dreyer E.** 2006. Relationship between 595 optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon–nitrogen balance within leaves? *Plant, Cell and Environment* **29**, 1338–1348.
- Ounis A, Cerovic ZG, Briantais JM, Moya I.** 2001. Dual 600 excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote Sensing of Environment* **76**, 33–48.
- Pacala SW, Canham CD, Silander JAJ, Kobe RK.** 1994. Sapling growth as a function of resources in a north temperate forest. 605 *Canadian Journal of Forest Research* **24**, 2172–2183.
- Poorter H, Pepin S, Rijkers T, de Jong Y, Evans JR, Körner C.** 2006. Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 355–371. 610
- Poorter H, Villar R.** 1997. The fate of the acquired carbon in plants: chemical composition and construction cost. In: Bazzaz FA, Grace J, eds. *Plant resource allocation*. Academic Press, 39–72.
- Rousseaux MC, Julkunen-Tiitto R, Searles PS, Scopel AL, Aphalo PJ, Ballaré CL.** 2004. Solar UV-B radiation affects leaf 615 quality and insect herbivory in the southern beech tree *Nothofagus antarctica*. *Oecologia* **138**, 1–8.
- Singleton VL, Rossi JA.** 1965. Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144–158. 620
- Veit M, Beckert C, Höhne C, Bauer K, Geiger H.** 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* **38**, 881–891.

Annexe C: Article à soumettre à Oecologia.

Sandrine Barthod, Daniel Epron, Interspecific variations in construction cost associated to the leaf area renewal in understorey saplings of temperate tree species.

1 **Interspecific variations in construction cost associated to the leaf area renewal in**
2 **understorey saplings of temperate tree species.**

3

4 Sandrine Barthod ¹, Daniel Epron ²

5 (1) Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biologie Environnemental, EA 3184 USC
6 INRA, Pôle universitaire B.P. 71427, 25 211 Montbéliard CEDEX.

7 (2) Université Henri Poincaré – Nancy 1, UMR 1137 INRA - UHP Ecologie et
8 Ecophysiologie Forestières BP 239, 54506 Vandoeuvre cedex.

9

10 Correspondance : Daniel Epron Université Henri Poincaré – Nancy 1, UMR 1137 INRA –
11 UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières BP 239, 54506 Vandoeuvre cedex France

12 Tel: (33) 3 83 68 42 49

13 Fax: (33) 3 83 68 42 40

14 Daniel.Epron@scbiol.uhp-nancy.fr

15 Short title: Interspecific variations in construction cost

16

17 Abstract:

18 The construction cost of the current-year shoot (CC_A) measured the glucose requirement for
19 the construction of a unit shoot area. It includes the cost of the leaf as well as those of the
20 supporting structures (petioles, rachis and stems) of the current year shoot. The goal of this
21 work was to test the hypothesis that CC_A differs among saplings of nine temperate tree species
22 that co-occurred under a canopy and to relate these differences to the shade tolerance of the
23 species. CC_A differed among species with the lowest values in *T. cordata* and *U. glabra* (CC_A
24 < 41 g glucose m^{-2}) and the highest one in *S. torminalis*, *F. excelsior* and *A. campestre* (CC_A $>$
25 60 g glucose m^{-2}). These differences were mainly driven by differences in specific leaf area
26 among species (SLA) despite significant differences of leaf CC among species, from 1.13
27 g glucose g^{-1} in *U. glabra* to 1.44 g glucose g^{-1} in *F. sylvatica*. This wide variation in leaf CC
28 was positively related to lignin content and negatively related to mineral content of the leaf
29 tissues. The nine species were distinctively distributed on the factorial plane of a principal
30 component analysis (PCA) applied to the leaf traits (chemical composition, SLA, CC) while
31 the PCA failed to segregate species according to their shade tolerance. The hypothesis that the
32 shade tolerant species will be able to repay their construction cost faster than shade intolerant
33 ones under a given irradiance is therefore not supported by our results.

34

35 Key words: Construction cost, current-year shoot, shade-tolerance, specific leaf area

36 **Introduction**

37 Shade tolerance is ecologically important and is viewed as a driving mechanism behind
38 succession (Pacala et al. 1994), where shade-intolerant species are replaced by species that are
39 able to reproduce and grow in shade (Kobe et al. 1995). Shade tolerance in tree species is,
40 however, difficult to characterise and to quantify. Early classifications of species according to
41 their tolerance to shade were based on their autecological characteristics (Baker 1949; Burns
42 and Honkala 1990; Rameau et al. 1993). Probability of the mortality and maximum livehood
43 (e.g. survival analysis) have further been used as a more quantitative estimates of shade
44 tolerance (Kobe et al. 1995; Kobe 1996; Kobe and Coates 1997).

45 It was first acknowledged that shade tolerance was associated with high carbon acquisition
46 capacities under low light conditions (Boardman 1977; Walters and Reich 2000; Landhäusser
47 and Loeffers 2001) but it was further recognised that not only photosynthetic performance at
48 the leaf level but the whole plant carbon balance has to be considered (Givnish 1988; Walters
49 and Reich 1999; Messier et al. 1999). Survival of trees at juvenile growth stages under shade
50 is therefore thought to rely on their ability to maintain a positive carbon balance under
51 limiting light conditions during a whole year.

52 The whole plant carbon balance depends not only on the photosynthetic capacity of individual
53 leaves, but also on their ability of intercepting light and on the energetic costs of producing
54 and maintaining their assimilatory area as well as their non photosynthetic organs. The lowest
55 the cost of leaf area renewal, the shortest the payback time will be and the fastest the leaves
56 will become a source of carbon for growth and maintenance of the whole plant (Williams et al.
57 1989; Poorter 1994; Barthod and Epron 2005; Poorter et al. 2006).

58 The construction cost represents the amount of photoassimilates needed to provide a plant
59 mass unit, expressed as the amount of glucose (g) required for the formation of 1g of dry mass
60 (Penning De Vries et al. 1974; Williams et al. 1987; Poorter 1994). Since the amount of

61 glucose required for synthesising 1 gram of a specific compound vary widely from 0.9 g
62 (organic acids) to 3 g (lipid), the construction cost of a plant tissue depends on its chemical
63 composition (Penning De Vries et al. 1974; Lambers and Poorter 1992).

64 Expressed on an area basis, the construction cost of the current-year shoot (CC_A) measured
65 the glucose requirement for the construction of a unit shoot surface area. It includes the cost of
66 the leaf as well as those of the supporting structures (petioles, rachis and stems) of the current
67 year shoot. It depends on the biochemical composition of these organs, their relative
68 contribution to the shoot biomass and specific leaf area (Barthod and Epron 2005). Assuming
69 that photosynthetic carbon assimilation is related to leaf area, CC_A is a rough estimate for the
70 ratio of carbon cost to carbon gain and it is positively related to the time required for a current
71 year shoot to become a carbon source under a given irradiance.

72 The goal of this work was to test the hypothesis that the construction cost of current-year
73 shoot per unit leaf area of saplings of temperate trees differed between species that co-
74 occurred under a canopy. If CC_A differed, we were interested in both biochemical and
75 morphological features that account for these differences and in relating these differences to
76 the shade tolerance of the species.

77 **Material and methods**

78 *Site description*

79 The study was carried out in a naturally regenerated stand in Eastern France (Graouilly Forest,
80 49°05'N, 6°02'E, 300 m elevation). Monthly average for air temperature ranged between
81 1.6°C in January to 18.7°C in July and total annual rainfall was 745 mm (data from Météo
82 France, Metz-Augny, 1946-2001 periods). The overstorey is dominated by *Acer*
83 *pseudoplatanus* L. and *Fagus sylvatica* L with some individuals of *Sorbus torminalis* L.; *S.*
84 *aria* L.; *Acer campestre* L.; *A. platanooides* L.; *Ulmus glabra* Huds, *Fraxinus excelsior* L. and
85 *Tilia cordata* P. Mill. Saplings of these nine woody deciduous species are relatively abundant
86 in the understorey of the Graouilly forest.

87 We classified these nine species according to their temperament using both autecology criteria
88 found in the French forest flora (Rameau et al. 1993) and on the Ellenberg's index for light
89 (Ellenberg et al. 1992). While the first qualifies the species as heliophilous, as semi-shade
90 tolerant or shade tolerant at the adult stage, the second ranks juveniles from 1 (sciaphytes
91 species) to 6 (heliophytes species). Combining these two ranking, *S. aria* and *A. campestre*
92 were the less shade tolerant species ; while *U. glabra*, *A. pseudoplatanus* and *F. sylvatica* are
93 the more shade tolerant ones, *T. cordata*, *F. excelsior*, *S. torminalis* and *A. platanooides* been
94 intermediate. The species were arranged from the less shade tolerant to the more shade
95 tolerant in the figures (see results).

96

97 *Sampling*

98 Current-year shoot of 9 to 24 saplings of each species were sampled in July 2004 in the
99 understorey from 10 to 20% of relative irradiance as estimated from hemispherical
100 photograph (Barthod and Epron 2005). The height range of sampled saplings was restricted
101 between 0.5 and 1.0 m to avoid ontogenetic variations in measured parameters (Niinemets

2006). The current-year shoots were stored in an icebox and transferred into a fridge (4°C) every evening. Current-year shoots were divided into stems, petioles (or rachis) and leaf (or leaflet), except for *U. glabra* where the leaf and the petiole cannot be analysed separately because of their small size. In this study, the terms leaf or leaflet corresponds to the lamina with the ribbing and without the petioles or rachis. Leaf area was measured with a leaf area meter (LI-3000A, Li Cor, Nebraska, USA). Leaf dry mass was estimated after freeze drying. Dry mass of other organs (current-year stems, petioles, rachis) was estimated after oven drying the samples at 60°C for at least 48h. Specific leaf area (SLA, m² g⁻¹) was calculated as the ratio between leaf area and leaf dry mass. LWR, PWR and SWR are respectively the relative biomass of leaves (or leaflets), petioles (or rachis) and stems. All samples were ground to a fine powder and stored dry until analysis.

113

114 *Construction costs*

115 Construction costs of all organs (CC, g glucose g⁻¹) were first calculated from carbon (C, g g⁻¹) and minerals (A, g g⁻¹) contents assuming non-additional cost for nitrate reduction (Vertregt and Penning De Vries 1987):

$$118 \quad CC = \left[-1.041 + \frac{5.077 \times C}{(1 - A)} \right] \times (1 - A) \quad [1]$$

119 An additional cost for nitrate reduction in non-photosynthetic tissues (5.325×N) with N the nitrogen content of the tissue (g g⁻¹) was also considered and was shown on the graphs (see results).

122 Construction cost of the current-year shoot per unit leaf area (shoot CC_A, g glucose m⁻²) was calculated from the construction cost per unit dry mass of the leaves, petioles and stems (CC_L, CC_P and CC_S respectively), their relative contribution to the biomass of the current-year shoot (LWR, PWR and SWR) and the specific leaf area (SLA, m² g⁻¹):

$$126 \quad CC_A = \frac{[CC_L \times LWR + CC_P \times PWR + CC_S \times SWR]}{(SLA \times LWR)} \quad [2]$$

127 *Leaf extraction, chemical analysis and calculations*

128 Total carbon and nitrogen contents were determined with an elemental microanalyser (NCS
129 2500, Thermoquest, Italy) on the homogenized organ powder. Protein content was calculated
130 by multiplying total N by 6.25, assuming that all nitrogen was organic nitrogen. Mineral
131 content was approximated by the ash content that was determined by weighing the remaining
132 mass of an aliquote of the homogenized leaf powder after combustion in a muffle furnace at
133 550°C for 6h.

134 A complete biochemical analyses was done on a subset of leaves saplings (4 to 16).
135 Biochemical compounds were categorized in a limited number of classes of constituents,
136 which yields the “proximate” chemical composition (Penning De Vries et al. 1974). The
137 procedure was adapted from Poorter et al. (1997). A 150 mg aliquot of the homogenized leaf
138 powder was extracted twice with 10 mL of a mixture containing methanol, chloroform (2/2:
139 v/v) according to Bligh and Dyer (1959). Extracts were vortexed and kept for 30 min at room
140 temperature to allow for complete solvent extraction. After addition of water in the methanol
141 chloroform mixture (1/2/2: v/v/v), the whole extract was filtered through a borosilicate filter
142 (DURAN®, porosity 3 corresponding to diameter of the pores from 16 to 40µm). The filtrate
143 contains the two phases: a chloroform phase at the bottom and a methanol/water phase on the
144 top. The residue remains in the filter (R1). Extractions were repeated twice.

145 The methanol phase is collected using a Pasteur pipette and kept at -20°C until analysis. This
146 phase contains the soluble sugars (glucose, sucrose soluble, fructan...) and the soluble
147 phenolics compounds. Soluble phenolics were measured with the Folin-Ciocalteus reagent
148 (Singleton and Rossi 1965). The chloroform phase is evaporated under nitrogen and the dry
149 residue weighed (R2). Lipids contents correspond to the mass of the residue (R2) after
150 evaporation since it contains phospholipids, galactolipids as well as some sterols.

151 The residue R1 contains mainly cell walls debris and insoluble non structural carbohydrates
152 left over after extraction with chloroform/methanol. R1 was suspended in 3% HCl, and the
153 suspension was boiled for 3h at 100°C. This breaks down starch, as well as the remainder
154 fructan, pectin and some part of the hemicellulose. The suspension was filtered through a
155 borosilicate filter (DURAN®, porosity 3), dried, weighed and used for total carbon and
156 nitrogen determination. The residue R3 contains the crude cell walls free of non structural
157 carbohydrates. Lignin and (hemi)cellulose contents were calculated from carbon and nitrogen
158 contents of R3, and assuming an average carbon content of 530 mg g⁻¹ for protein, 640 mg g⁻¹
159 for lignin and 440 mg g⁻¹ for (hemi)cellulose (Poorter et al. 1997). Organic acids and soluble
160 and insoluble non structural carbohydrates were not estimated in this study.

161

162 *Statistical analysis*

163 For each parameter and each species, mean values and standard deviations were calculated.
164 Differences in measured parameters between species were analysed by one way analyses of
165 variance (ANOVA) followed by multiple comparisons Tukey's test. Principal component
166 analysis (PCA) was used to explore simultaneously the variability of biochemical leaf traits, a
167 morphological one (SLA) and leaf construction cost.

168 **Results**169 *Construction cost of the current-year shoot*

170 Since the nutritional preferences of the nine species were unknown, the true CC ranged
171 between a minimal value assuming ammonium nutrition and a maximal value assuming
172 nitrate nutrition and reduction in non photosynthetic organs (boxes in Fig 1). Nitrate reduction
173 in non photosynthetic organs would add an extra cost of approximately 10% in leaf and less
174 than 4% in petioles, rachis and stems. Similarly, it would increase CC_A by less than 10% and
175 it would not change the difference between species.

176 Construction cost of the current-year shoot per unit leaf area (shoot CC_A) differed between
177 species (Fig 1a, $p < 0.001$) with the lowest values in *T. cordata* and *U. glabra* ($CC_A < 41$
178 g glucose m^{-2} , assuming ammonium nutrition) and the highest one in *S. torminalis*, *F.*
179 *excelsior* and *A. campestre* ($CC_A > 60 \text{ g glucose m}^{-2}$, assuming ammonium nutrition). This
180 was at least partly explained by differences in leaf construction costs that significantly varied
181 among species (Fig 1b, $p < 0.001$) from $1.13 \text{ g glucose g}^{-1}$ in *U. glabra* to $1.44 \text{ g glucose g}^{-1}$ in
182 *F. sylvatica*, assuming ammonium nutrition. All values are significantly different from each
183 other except those of *S. aria* and *A. platanoides*. Petioles construction costs were significantly
184 different between species (Fig 1c, $p < 0.001$) and ranged between $1.20 \text{ g glucose g}^{-1}$ for *A.*
185 *pseudoplatanus* and $1.34 \text{ g glucose g}^{-1}$ for *F. sylvatica*, assuming ammonium nutrition.
186 Construction cost of rachis of compound leaves (*F. excelsior*) was at the lower boundary of
187 the range of those of petioles of simple leaves ($1.21 \text{ g glucose g}^{-1}$). Stems construction costs
188 were also significantly different between species (Fig 1d, $p < 0.05$) and ranged between 1.29
189 g glucose g^{-1} for *T. cordata* and $1.43 \text{ g glucose g}^{-1}$ for *F. sylvatica*, assuming ammonium
190 nutrition. For all organs, *F. sylvatica* had the highest construction cost per unit of dry mass,
191 followed by *S. torminalis*. In contrast, *U. glabra* and *F. excelsior* had the lowest. Despite

192 marked differences among species, there was no clear trend according to the ranking of
193 species along a tolerance axis.

194

195 *Allocation of biomass and specific leaf area*

196 The petiole contribution to the biomass of the current-year shoot was negligible in *U. glabra*,
197 *F. sylvatica* and *S. aria* (< 5%) while petioles of the three *Acer* species and rachis of *F.*
198 *excelsior* accounted for more than 12% of the biomass of the current-year shoot (Fig 2a). In
199 contrast, stem accounted for less than 12% of the biomass of the current-year shoot in *Acer*
200 species while it largely contributed in *Sorbus* species, in *U. glabra* and in *F. excelsior* (>
201 16%). As expected, leaf accounted for less than 70% of the biomass of the current-year shoot
202 in *F. excelsior*, while it accounted for more than 83% in *F. sylvatica* and in *U. glabra*.
203 Whatever, leaf was the major part of the biomass of the current-year shoot.

204 Specific leaf area (SLA) differed markedly between species (Fig 2b, $p < 0.001$) with highest
205 values in *T. cordata* ($42 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), *F. sylvatica* ($37 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) and in *U. glabra* ($36 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) and
206 the lowest values in *S. torminalis*, *A. campestre* and *F. excelsior* with values close or below 30
207 $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$. Species which had the lowest SLA have the highest CC_A . Conversely species which
208 had the highest SLA have the lowest CC_A , except *F. sylvatica* because of high organ CC. This
209 is particularly true for the leaf which accounted for most of the mass of the current-year shoot.

210

211 *Leaf chemical composition*

212 Organic acids and soluble and non structural carbohydrates were not estimated in this study.
213 The sum of the 6 studied constituents accounted for 64% to 78% of the leaf mass. Contents of
214 all studied chemical constituents were significantly different between species (Fig 3a-f, $p <$
215 0.001). The highest leaf protein content derived from total N content was observed in *T.*
216 *cordata* (210 mg g^{-1}) and the lowest were observed in *Sorbus* species ($< 130 \text{ mg g}^{-1}$). The

217 highest and the lowest values of leaf minerals content differed by a factor of 4 (45 mg g⁻¹ in *F.*
218 *excelsior* and 160 mg g⁻¹ in *U. glabra*). Lipids also varied markedly from 74 mg g⁻¹ in *U.*
219 *glabra* up to 142 mg g⁻¹ in *A. pseudoplatanus*. *U. glabra* also exhibited the lowest content in
220 soluble phenolics compounds (12 mg g⁻¹) while 10-fold higher values were found in *A.*
221 *campestre*, *A. pseudoplatanus* and *F. excelsior*. *U. glabra* exhibited the highest
222 (hemi)cellulose content like *F. sylvatica* and *S. aria*. *U. glabra* contained very few amount of
223 lignin while *F. sylvatica* exhibited the highest one.

224 The construction cost of the leaf was strongly correlated with the lignin content (positive, $r =$
225 $+0.88$, Fig 3f) and with ash contents (negative, $r = -0.87c$). Both lignin and mineral contents
226 were correlated together (negative, $r = -0.85$, data not showed). A principal component
227 analysis (PCA) was applied to the leaf traits (chemical composition, SLA, CC). The first axis
228 (Fig 4a) explains 34% of the observed variability. The main contributors of this first principal
229 axis were the lignin contents and construction costs (positive factorial coordinate) and the
230 mineral contents (negative factorial coordinate). The second axis explains 23% of the
231 observed variability. The main contributors of this second principal axis were SLA and the
232 contents in proteins and cellulose (positive coordinates) and the contents in phenols and lipids
233 (negative coordinates). The nine species were distinctively distributed on the factorial plane,
234 saplings of each species forming distinct aggregates (Fig 4b). However, the three groups of
235 species according to their shade tolerance didn't formed clusters on the factorial plane (Fig
236 4b).

237 **Discussion**238 *Determinants of CC_A*

239 The cost which is associated to the leaf area renewal that enables light interception and
240 photosynthetic assimilation has been defined as the amount of glucose equivalent per unit leaf
241 area that is required for growing the current-year shoot (CC_A , Barthod and Epron 2005). Up to
242 now, most studies have considered the construction cost of leaves and there payback time
243 ignoring that a leaf does not function by itself but required support structures (Poorter 1994).
244 CC_A adds an energetic component to the dry mass costs of deploying leaf area proposed by
245 Pickup et al. (2005). Assuming that photosynthetic carbon assimilation is well related to leaf
246 area, CC_A is a rough proxy for the ratio of cost to benefit. It is though to be related to the time
247 required for a current year shoot to become a carbon source under a given irradiance. The
248 ratio of cost to benefit may be a trait related to shade tolerance because a low ratio will
249 reduced the time required for the current year shoot to repay it own cost and to become a net
250 source of carbon for the remaining parts of the saplings (Williams et al. 1989; Poorter et al.
251 2006).

252 Interspecific variation in CC_A was already reported between two of the nine species studied
253 here (Barthod and Epron 2005) and the present results demonstrated that CC_A differed among
254 species sharing the same environment. The amount of glucose required for deploying 1 m² of
255 leaf area ranged between 41 and 69 g. Interspecific differences in CC_A can be ascribed to
256 either morphological changes (differences in SLA or in biomass partitioning between stems,
257 petioles and leaves in the current-year shoot) or biochemical changes (differences in organs
258 construction costs). Large variations in specific leaf area (SLA) and in biomass allocation
259 within the current-year shoot were observed between species and construction cost of stems,
260 petioles and leaves also differed between species.

261 On average, the woody stems are more expensive than leaves in this study in contrast to what
262 reported before (Poorter and Villar 1997), but this difference vanished when accounting for
263 nitrate reduction in non photosynthetic organs. Petiole CC were lower than leaf CC as already
264 reported on a few number of species (Niinemets 1998; Barthod and Epron 2005). Whatever,
265 species exhibiting high leaf CC also exhibited high stem CC and high petiole CC (Spearman
266 rank correlations, $p < 0.05$). This is not in agreement with the hypothesis that species that have
267 less mechanical support in their stems will require more support in the leaves (Pickup et al.
268 2005).

269 Large interspecific variations in leaf CC were already reported but these differences have
270 often been highlighted between functional group of species like herbaceous versus trees,
271 deciduous versus evergreen or angiosperm versus gymnosperm (Merino et al 1987; Griffin
272 1994; Poorter 1994; Poorter and Villar 1997; Eamus et al. 1999; Villar and Merino 2001;
273 Navas et al. 2003). It also differed in plants differing in their ecological strategy (P'yankov et
274 al. 2001a) or between indigenous and invasive species (Baruch and Goldstein 1999). Here, we
275 observed variations in saplings of temperate deciduous tree species from the same
276 environment, and the variation was quite large for leaves (1.13-1.44). This contrasts with
277 previous studies showing only weak variations between *Piper* species leaving in the
278 understorey (Williams et al. 1989) or between leaves of deciduous trees species (Villar and
279 Merino 2001). As the extent to which the 9 studied species take up NO_3^- and NH_4^+ was not
280 known, these values (1.13-1.44) should however be considered as a conservative estimate.
281 They fell within the range of published values for temperate woody species (Nagel et al.
282 2002).

283 However, there was no correlation between leaf CC and CC_A among species despite this large
284 interspecific variation in leaf CC and despite the fact that leaves account for more than 70% of
285 the biomass of current-year shoot. The interspecific variation in CC_A was mostly explained by

286 those of SLA ($r = 0.96$, $p < 0.001$) confirming that variation of energetic requirement for leaf
287 area deployment is controlled by SLA and that SLA is more important than leaf CC for the
288 plant carbon balance (Villar and Merino 2001; Nagel et al. 2002; Wright et al. 2004).

289

290 *Biochemical determinants of leaf CC*

291 Despite the lack of correlation between CC_A and leaf CC, the large variation in leaf CC
292 suggest a large variation in the biochemical composition if the leaf of these co-occurring
293 saplings. Leaf chemical composition of the nine studied species was in the range of published
294 values for leaves of woody species from different ecosystems (Poorter and Villar 1997;
295 P'yankov et al. 2001b). *U. glabra* exhibited a low leaf CC and contained more minerals (ash)
296 and cellulose than other species and less lipids, soluble phenolics and lignin, i.e. more cheaper
297 constituents and less expensive one when compared with other species. The high leaf CC of *F.*
298 *sylvatica* and *A. Pseudoplatanus* were well related to both lignin and lipids contents.
299 Difference in leaf CC between evergreen, semi deciduous and deciduous woody species is
300 known to be well related to lipid content (Villar and Merino 2001). But most of the studied
301 species exhibited a high level of one expensive constituent (lignin, lipids, phenolics or
302 proteins) together a high level of a cheaper one (minerals, TSC), or a balance between two
303 expensive constituents or two cheaper ones. This was for instance the case for *T. cordata* that
304 exhibited high level of protein but low levels of lignin and phenolic, for *F. excelsior* that
305 exhibited high level of both ash and soluble phenolic, or for *F. sylvatica* that exhibited high
306 cellulose content but low ash content. Such balancing effect among leaf constituent seems to
307 be a common feature in plants (Chapin III 1989; Poorter and Bergkotte 1992). The lack of
308 interspecific variations in leaf CC in previous studies had indeed been related to negative
309 correlations between expensive constituents (Chapin III 1989). But in this study, we observed
310 negative correlations between expensive and cheap constituents (e.g. lignin and ash, $r = -0.85$

311 and cellulose and soluble phenolic, $r = -0.72$) that may account for the large interspecific
312 variation in leaf CC. The main factors explaining interspecific variations in leaf CC were,
313 indeed, the amount of minerals and those of lignin. High mineral content was thought to
314 explain the low construction cost of tomato leaves (Gary et al. 1998) and variation in lignin
315 content accounted for the variation in needle CC with tree height in *Picea abies* trees
316 (Niinemets 1997).

317

318 *Implication for shade tolerance*

319 It has been suggested that difference in CC_A would explained difference in the ability of
320 species to tolerate stressful conditions. Some have claimed that CC would be higher in
321 stressful habitats (Penning De Vries et al. 1974; Merino et al. 1984). This was well illustrated
322 for boreal species with species exhibiting the stress-tolerant ecological strategy of Grime
323 exhibiting the highest CC values (P'yankov et al. 2001a). Others, in contrast, have
324 hypothesized that minimizing CC would enhance carbon gain and therefore fitness, since a
325 lower CC was ascribed to a more efficient use of carbon resource. Higher fitness of invasive
326 *versus* indigenous species has indeed been related to lower leaf CC. This difference was even
327 more pronounced when expressed per unit area as invasive species also exhibited high SLA
328 (Nagel and Griffin 2001; Baruch and Goldstein 1999; Nagel et al. 2002).

329 It has been shown that the leaf construction cost was higher in *Piper* species from sunny
330 habitat (early-successional species) than in species from shaded habitat (late-successional
331 species, Williams et al. 1989). This contrasted with our results showing that *F. sylvatica* and *A.*
332 *pseudoplatanus* in a lesser extent, typical shade tolerant species, exhibited the highest leaf CC
333 while the lowest cost was also found in a tolerant one, *U. glabra*.

334 Similarly, SLA, a plant trait that account for area based processes like photosynthetic
335 assimilation and light interception (Reich et al. 1998; Wright et al. 2004), did not reflect the

336 species temperament in this study. Two of the three shade tolerant species exhibited high SLA
337 values but one (*A. pseudoplatanus*) had low SLA values similar to those in shade intolerant
338 ones. This contrasted with the hypothesis that strong competition for light will favor species
339 with high SLA (Poorter and de Jong 1999).

340 In conclusion, and in spite of a large interspecific variation in leaf CC that mainly reflects
341 changes in lignin and mineral contents, and in CC_A that was driven by differences in SLA,
342 shade tolerance of deciduous tree species at juvenile growth stage is not related to lower CC_A .
343 The hypothesis that the shade tolerant species will be able to repay their construction cost
344 faster than shade intolerant ones under a given irradiance is therefore not supported by our
345 results.

346 **Acknowledgements**

347 The authors thank Jacqueline Marchand, Marie-Laure Toussaint and Marielle Franchi for their
348 help in laboratory analysis. This work was partially supported by the “Réseau de
349 l’Ecophysiologie de l’Arbre” (INRA, France). Authors declare these experiments comply with
350 the current laws of France.

351 **References**

- 352 Baker FS (1949) A revised tolerance table. *J. Forest.* 47, 179-181
- 353 Barthod S, Epron D (2005) Variations of construction cost associated to leaf area renewal in
354 saplings of two co-occurring temperate tree species (*Acer platanoides* L. and *Fraxinus*
355 *excelsior* L.) along a light gradient. *Ann. Sci. For.* 62:545-551
- 356 Baruch Z, Goldstein G (1999) Leaf construction cost, nutrient concentration, and net CO₂
357 assimilation of native and invasive species in Hawaii. *Oecologia* 121:183-192
- 358 Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J.*
359 *Biochem. Physiol.* 37:911-917
- 360 Boardman NK (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu. Rev. Plant*
361 *Physiol.* 28:355–377
- 362 Burns RM, Honkala BH (1990), *Silvics of North America: 1. Conifers; 2. Hardwoods.*
363 *Agriculture Handbook 654.* U.S. Department of Agriculture, Forest Service,
364 Washington, DC. vol.2, 877 p.
- 365 Chapin III SF (1989) The cost of tundra plant structures: evaluation of concepts and
366 currencies. *Am. Nat.* 133:1-19
- 367 Eamus D, Myers B, Duff G, Williams R (1999) A cost-benefit analysis of leaves of eight
368 Australian savanna tree species of differing leaf life-span. *Photosynthetica* 36:575-586
- 369 Ellenberg H, Weber HE, Düll R, Wirth V, Werner W, Paulißen D, *Zeigerwerte von Pflanzen*
370 *in Mitteleuropa, Scripta Geobotanica* 18, Goltze, Göttingen, 1992.
- 371 Gary C, Bertin N, Frossard J-S, Le Bot J (1998) High mineral contents explain the low
372 construction cost of leaves, stems and fruits of tomato plants. *J. Exp. Bot.* 49:49-57
- 373 Givnish TJ (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Aust. J. Plant*
374 *Physiol.* 15:63-92

- 375 Griffin KL (1994) Calorimetric estimates of construction cost and their use in ecological
376 studies. *Funct. Ecol.* 8:551-562
- 377 Kobe RK (1996) Intraspecific variation in sapling mortality and growth predicts geographic
378 variation in forest composition. *Ecological monographs* 66:181-201
- 379 Kobe RK, Coates KD (1997) Models of sapling mortality as a function of growth to
380 characterize interspecific variation in shade tolerance of eight tree species of
381 northwestern British Columbia. *Can. J. For. Res.* 27:227-236
- 382 Kobe RK, Pacala SW, Silander JA, Canham CD (1995) Juvenile tree survivorship as a
383 component of shade tolerance. *Ecological Applications* 5:517-532
- 384 Lambers H, Poorter H (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants : a
385 search for physiological causes and ecological consequences *Adv. Ecol. Res.* 23 : 187-
386 261
- 387 Landhäusser SM, Lieffers VJ (2001) Photosynthesis and carbon allocation of six boreal tree
388 species grown in understory and open conditions. *Tree Physiol.* 21:243-250
- 389 Merino JA, Field CB, Mooney HA (1984) Construction and maintenance costs of
390 mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. II. Biochemical pathway
391 analysis. *Acta Oecol.* 5:211-229
- 392 Messier C, Doucet R, Ruel J-C, Claveau Y, Kelly C, Lechowicz MJ (1999) Functional
393 ecology of advance regeneration in relation to light in boreal forests. *Can. J. For. Res.*
394 29:812-823
- 395 Nagel JM, Griffin KL (2001) Construction cost and invasive potential: comparing *Lythrum*
396 *salicaria* (Lythraceae) with co-occurring native species along pond banks¹. *Am. J. Bot.*
397 88:2252-2258

- 398 Nagel JM, Griffin KL, Schuster WSF, Tissue DT, Turnbull MH, Brown KJ, Whitehead D
399 (2002) Energy investment in leaves of red maple and co-occurring oaks within a
400 forested watershed. *Tree Physiol.* 22:859
- 401 Navas M-L, Ducout B, Roumet C, Richarte J, Garnier J, Garnier E (2003) Leaf life span,
402 dynamics and construction cost of species from Mediterranean old-fields in
403 successional status. *New Phytol.* 159:213-228
- 404 Niinemets Ü (2006) The controversy over traits conferring shade-tolerance in trees:
405 ontogenetic changes revisited. *J. Ecol.* 94:464-470
- 406 Niinemets Ü (1997) Energy requirement for foliage construction depends on tree size in
407 young *Picea abies* trees. *Trees* 11:420-431
- 408 Niinemets Ü (1998) Are compound-leaved woody species inherently shade-intolerant? An
409 analysis of species ecological requirements and foliar support costs. *Plant Ecol.* 134:1-
410 11
- 411 Pacala W, Canham C, Silander JA, Kobe RK (1994) Sapling growths as a function of
412 resources in a north temperate forest. *Can. J. For. Res.* 24, 11: 2172-2183
- 413 Penning De Vries FWT, Brunsting AHM, van Laar HH (1974) Products, requirements and
414 efficiency of biosynthesis: a quantitative approach. *J. Theor. Biol.* 45:339-377
- 415 Pickup M, Westoby M, Basden A (2005) Dry mass costs of deploying leaf area in relation to
416 leaf size. *Funct. Ecol.* 19:88-97
- 417 Poorter H (1994) Construction costs and payback time of biomass: a whole plant perspective.
418 In: Roy J, Garnier E (eds) *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions.*
419 SPB, The Hague, pp 111-127
- 420 Poorter H, Bergkotte M (1992) Chemical composition of 24 wild species differing in relative
421 growth rate. *Plant Cell Environ* 15:221-229

- 422 Poorter H, de Jong R (1999) A comparison of specific leaf area, chemical composition and
423 leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New*
424 *Phytol.* 143:163-176
- 425 Poorter H, Pepin S, Rijkers T, de Jong Y, Evans JR, Körner C (2006) Construction costs,
426 chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *J. Exp.*
427 *Bot.* 57:355-371
- 428 Poorter H, Van Berkel Y, Baxter B, Bel M, Den Hertog J, Dijkstra P, Gifford RM, Griffin KL,
429 Roumet C, Wong SC (1997) The effect of elevated CO₂ on the chemical composition
430 and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant Cell Environ* 20:472-482
- 431 Poorter H, Villar R (1997) The fate of the acquired carbon in plants: chemical composition
432 and construction costs. In: *Plant Resource Allocation*. Academic Press, pp 39-72
- 433 P'yankov VI, Ivanov LA, Lambers H (2001a) Plant Construction Cost in the Boreal Species
434 Differing in Their Ecological Strategies. *Russian Journal of Plant Physiology* 48:67-73
- 435 P'yankov VI, Ivanov LA, Lambers H (2001b) Chemical Composition of the Leaves of Plants
436 with Different Ecological Strategies from the Boreal Zone. *Russian Journal of Ecology*
437 32:221-229
- 438 Rameau J, Mansion M, Dumé G (1993) *Flore forestière française, guide écologique illustré*,
439 Institut pour le développement forestier, Paris edn
- 440 Reich PB, Tjoelker MG, Walters MB, Vanderklein DW, Buschena C. (1998) Close
441 association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in
442 seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology*,
443 12, 327-338.
- 444 Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-
445 Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:3:144-158

- 446 Vertregt N, Penning De Vries FWT (1987) A Rapid method for determining the efficiency of
447 biosynthesis of plant biomass. *J. Theor. Biol.* 128:109-119
- 448 Villar R, Merino J (2001) Comparison of leaf construction costs in woody species with
449 differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytol.* 151:213-226
- 450 Walters MB, Reich PB (1999) Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings
451 of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? *New*
452 *Phytol.* 143:143-154
- 453 Walters MB, Reich PB (2000) Trade-offs in low-light CO₂ exchange: a component of
454 variation in shade tolerance among cold temperate tree seedlings. *Functional Ecology*,
455 14, 155-165.
- 456 Williams KF, Field CB, Mooney HA (1989) Relationships among leaf construction cost, leaf
457 longevity and light environment in rain-forest plants of the Genus *Piper*. *Am. Nat.*
458 133:198-211
- 459 Williams KF, Percival F, Merino J, Mooney HA (1987) Estimation of tissue construction cost
460 from heat of combustion and organic nitrogen content. *Plant Cell Environ* 10:725-734
- 461 Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J,
462 Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J,
463 Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U,
464 Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, P'yankov PI, Roumet C, Thomas SC,
465 Tjoelker MG, Veneklaas EJ Villar R (2004) The worldwide leaf economics spectrum,
466 *Nature* 428 ,22 :

467 **Captions of figures**468 Figure 1

469 Mean construction cost of (a) the current-year shoot per unit of leaf area (Shoot CC_A), and the
 470 construction cost (CC) per unit dry mass of (b) leaves or leaflets, (c) petioles or rachis and (d)
 471 stems for *Sorbus aria* (Sa, n=19), *Acer campestre* (Ac, n=19), *Tilia cordata*. (Tc, n=17),
 472 *Fraxinus excelsior* (Fe, n=21), *S. torminalis* (St, n=9), *A. platanoides* (Ap, n=24), *Ulmus*
 473 *glabra* (Ug, n=9), *A. pseudoplatanus* (Aps, n=14) and *Fagus sylvatica* (Fs, n=21). The species
 474 were arranged according to their temperament between shade intolerant species (Sa, Ac),
 475 intermediate species (Tc, Fe, St, Ap) and shade tolerant species (Ug, Aps, Fs). The lower and
 476 the higher part are respectively CC calculated assuming ammonium nutrition and assuming
 477 nitrate reduction in non photosynthetic organs. Vertical bars represent standard deviation (-SD
 478 for ammonium nutrition and +SD for nitrate reduction in non photosynthetic organs).

479

480 Figure 2.

481 Mean relative contribution to shoot biomass (a, RM) of leaves or leaflets (grey bars), petioles
 482 or rachis (black bars) and stems (white bar) and mean specific leaf area (b, SLA) for *Sorbus*
 483 *aria* (Sa, n=19), *Acer campestre* (Ac, n=19), *Tilia cordata*. (Tc, n=17), *Fraxinus excelsior* (Fe,
 484 n=21), *S. torminalis* (St, n=9), *A. platanoides* (Ap, n=24), *Ulmus glabra* (Ug, n=9), *A.*
 485 *pseudoplatanus* (Aps, n=14) and *Fagus sylvatica* (Fs, n=21). The species were arranged
 486 according to their temperament between shade intolerant species (Sa, Ac), intermediate
 487 species (Tc, Fe, St, Ap) and shade tolerant species (Ug, Aps, Fs). Vertical bars represent
 488 standard deviation (\pm SD) in SLA.

489

490 Figure 3

491 Relationships between construction cost (CC) of leaves assuming ammonium nutrition and (a)

492 proteins, (b) phenolics, (c) minerals, (d) (hemi)cellulose, (e) lipids and (f) lignins contents of
493 leaves for *Sorbus aria* (Sa, white circles), *Acer campestre* (Ac, white squares), *Tilia cordata*.
494 (Tc, grey triangles), *Fraxinus excelsior* (Fe, grey diamonds), *S. torminalis* (St, grey circles), *A.*
495 *platanoides* (Ap, grey squares), *Ulmus glabra* (Ug, black circles), *A. pseudoplatanus* (Aps,
496 black squares) and *Fagus sylvatica* (Fs, black triangles). White symbols are used for shade
497 intolerant species (Sa, Ac), grey symbols for intermediate species (Tc, Fe, St, Ap) and black
498 symbols for shade tolerant species (Ug, Aps, Fs). Linear regression lines are drawn when
499 correlation coefficients (r) are significantly different from 0 ($p < 0.05$). The numbers of
500 replicates are the same than in Fig 1 and 2 for proteins and minerals, and the same than in Fig.
501 4 for others compounds.

502

503 Figure 4

504 Principal component analyze (PCA) ordinated according to 8 leaf traits (SLA, specific leaf
505 area; CC, leaf construction cost; PROT, protein contents; CELL, (hemi)cellulose contents;
506 LIG, lignin contents; MIN, mineral contents; LIP, lipids contents; PHE, phenolic contents)
507 with axis 1 explaining 34% and axis 2 explaining 23% of the variance of all studied saplings
508 (a) projection of the 8 variables on the factorial plane and (b) projection of all saplings on the
509 same factorial plane. Species are *Sorbus aria* (Sa, white circles, $n=7$), *Acer campestre* (Ac,
510 white squares, $n=7$), *Tilia cordata*. (Tc, grey triangles, $n=7$), *Fraxinus excelsior* (Fe, grey
511 diamonds, $n=6$), *S. torminalis* (St, grey circles, $n=4$), *A. platanoides* (Ap, grey squares, $n=9$),
512 *Ulmus glabra* (Ug, black circles, $n=4$), *A. pseudoplatanus* (Aps, black squares, $n=8$) and
513 *Fagus sylvatica* (Fs, black triangles, $n=16$). White symbols are used for shade intolerant
514 species (Sa, Ac), grey symbols for intermediate species (Tc, Fe, St, Ap) and black symbols for
515 shade tolerant species (Ug, Aps, Fs).

516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536

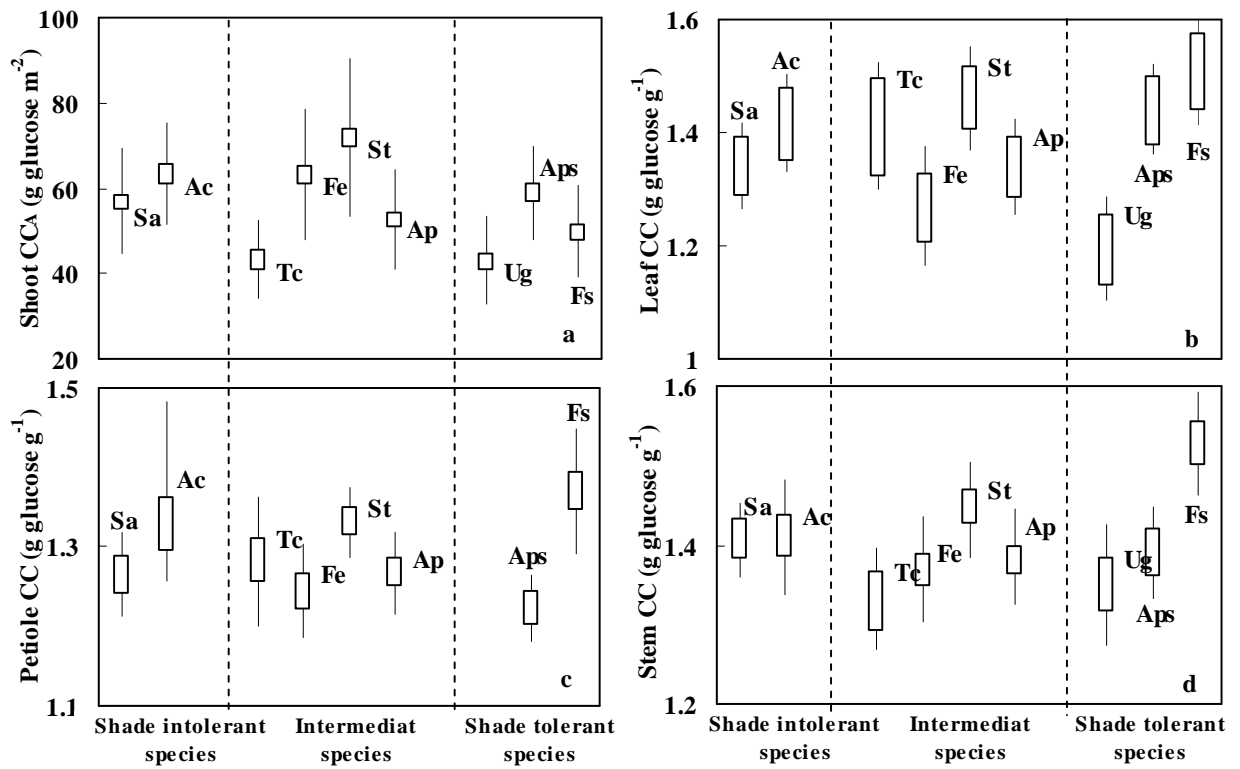


Figure 1

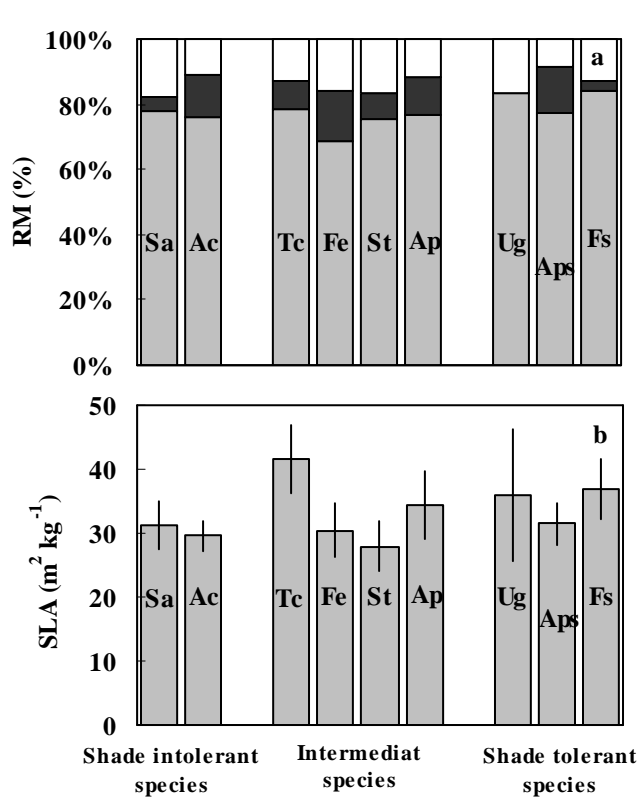


Figure 2

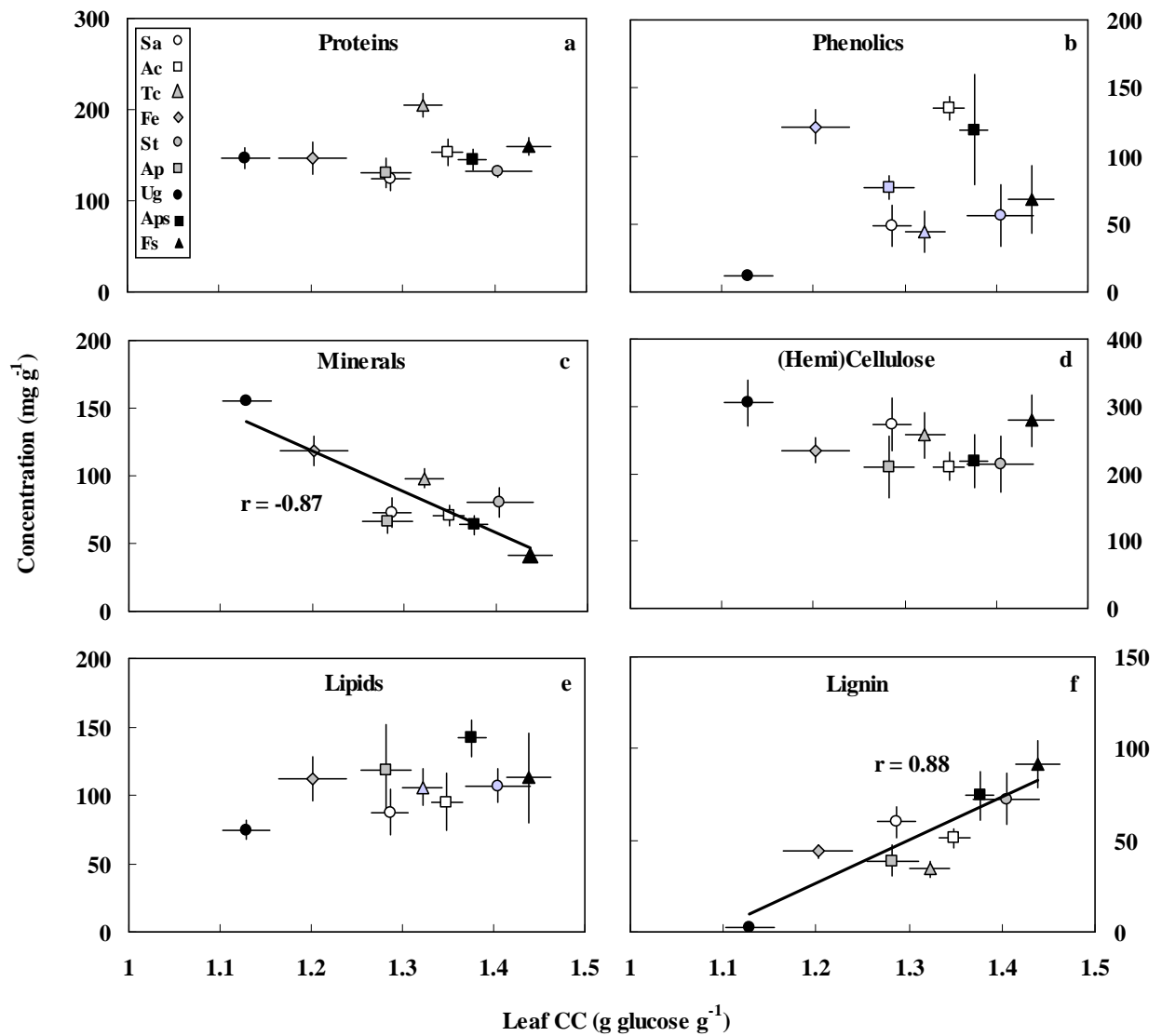


Figure 3

597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619

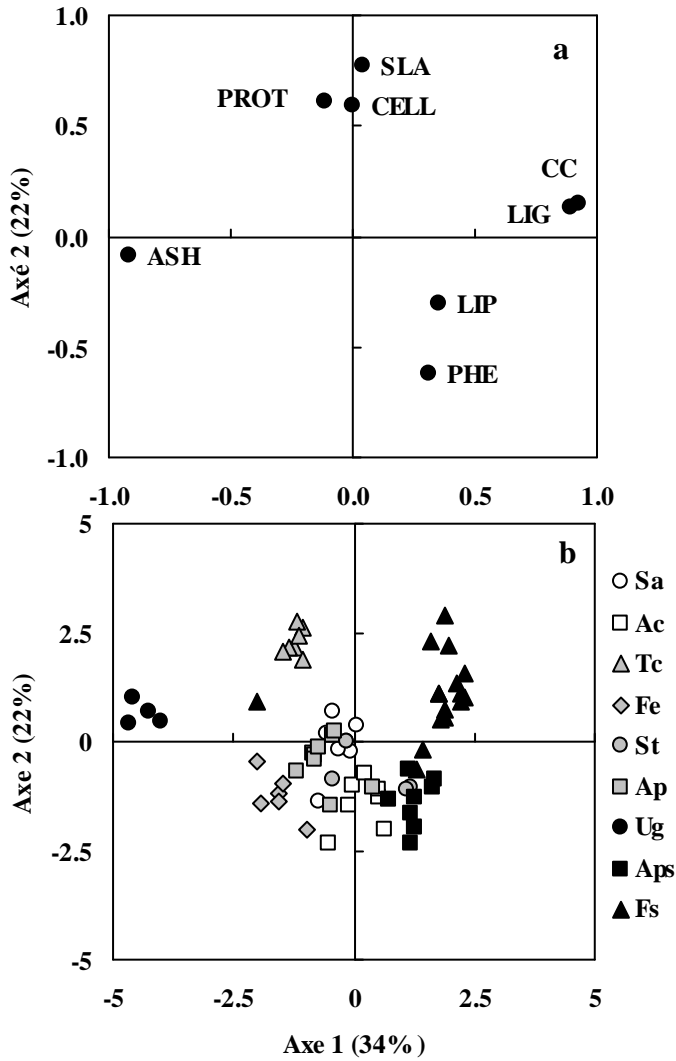


Figure 4

Annexe D :

Mesures micro-calorimétriques de la chaleur de combustion de la matière sèche et du résidu pariétal.

Annexe E :

Comparaison de méthodes pour estimer le contenu en LIG et en TSC dans le résidu pariétal.

Annexe F :

Protocole pour déterminer la composition biochimique du matériel végétal

Annexe D : Mesures micro-calorimétriques de la chaleur de combustion de la matière sèche et du résidu pariétal

Principe de la Micro-Calorimétrie

La chaleur de combustion est mesurée à l'aide d'une micro bombe calorimétrique adiabatique. Le dispositif expérimental comporte le calorimètre proprement dit (vase Dewar) dans lequel est placé la micro bombe calorimétrique : récipient cylindrique très résistant, en acier inoxydable, hermétiquement clos par un couvercle vissé.

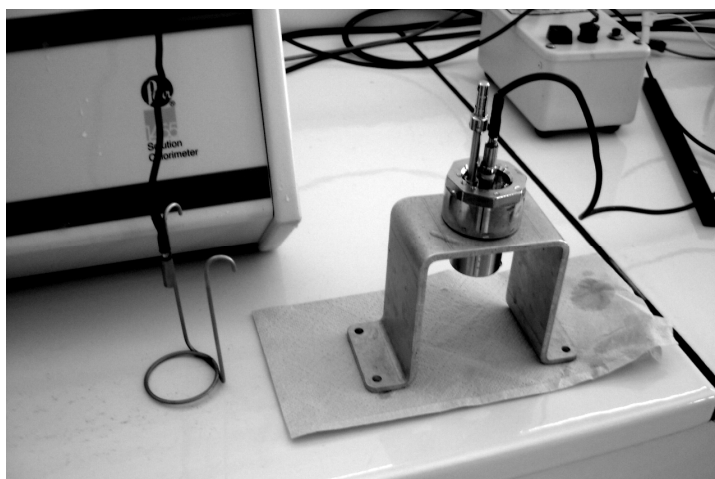
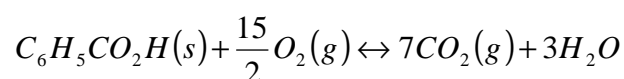


Figure 1-D: Photographie de la micro bombe calorimétrique du calorimètre de combustion Semi-Micro 1425 de Parr Instrument.

De 10 à 15 mg de la matière végétale est mise sous forme de pastille (1 cm de diamètre) puis placée dans une nacelle à l'intérieur de la bombe; celle-ci est ensuite remplie d'oxygène sous une pression d'environ 35 atm. Une résistance très fine positionnée au dessus de l'échantillon est chauffée par un courant électrique afin de démarrer la réaction. Une fois amorcée, la réaction est rapide et dégage une très grande quantité de chaleur. Cette quantité de chaleur est déterminée par l'élévation de température de l'eau qui entoure le calorimètre. La détermination de la chaleur de combustion d'une substance n'est généralement pas réalisée directement. En effet, le calorimètre doit être préalablement calibré par une réaction chimique pour laquelle la valeur de la chaleur de combustion est connue avec précision : la combustion de l'acide benzoïque en présence d'oxygène.

Calibration : détermination de la capacité calorifique du calorimètre**Équation 1-D: Combustion complète de l'acide benzoïque**

$C_6H_5CO_2H$: Formule brute de l'acide benzoïque

(s) : solide

(g) : gaz

ΔH benzoïque = chaleur de combustion de l'acide benzoïque 26 435 J g⁻¹

Connaissant la quantité de chaleur dégagée par la combustion de l'acide benzoïque et ayant mesuré l'augmentation de température produite dans l'ensemble calorimétrique, nous sommes en mesure de déterminer la capacité calorifique du calorimètre.

Équation 2-D : Quantité de chaleur produite par la combustion de l'acide benzoïque

$$Q_{cal} = m_{benzoïque} \times \Delta H_{benzoïque} + m_{fil} \times \Delta H_{fil}$$

Q_{cal} : quantité de chaleur produite par la combustion de l'acide benzoïque (kJ)

$m_{benzoïque}$: masse de la pastille d'acide benzoïque (g)

$\Delta H_{benzoïque}$: chaleur de combustion de l'acide benzoïque : 26,453 kJ g⁻¹

m_{fil} : masse du fil à combustion (g)

ΔH_{fil} : chaleur de combustion du fil à combustion : 5,857 kJ g⁻¹

La correction du fil correspond à la combustion du fil qui a brûlé durant la combustion de la matière végétale. Cette correction a été appliquée, elle est de l'ordre de 2%.

Équation 3-D : Quantité de chaleur absorbée par le calorimètre et ses accessoires

$$Q_{\text{syst}} = (m_{\text{H}_2\text{O}} + E) \times C_{p_{\text{H}_2\text{O}}} \times \Delta T$$

Q_{syst} : quantité de chaleur absorbée par le calorimètre et ses accessoires (kJ)

m_{eau} : masse d'eau introduite dans le vase Dewar (425 g)

E : masse en eau du microcalorimètre (g) capacité calorifique du microcalorimètre

$C_{p_{\text{eau}}}$: capacité thermique massique de l'eau $4,184 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$

ΔT : variation de température.

Équation 4-D : Calcul de la capacité calorifique du calorimètre

$$E = \frac{Q_{\text{cal}}}{(C_{p_{\text{eau}}} \times \Delta T)} - m_{\text{eau}}$$

E : masse en eau du microcalorimètre (g) capacité calorifique du calorimètre

Q_{cal} : quantité de chaleur produite par la combustion de l'acide benzoïque (kJ)

m_{eau} : masse d'eau introduite dans le vase Dewar (425 g)

$C_{p_{\text{eau}}}$: capacité thermique massique de l'eau $4,184 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$

ΔT : variation de température

Mesures expérimentales

Lorsque l'étalonnage (mesure de la capacité calorifique du calorimètre) est terminé, nous pouvons remplacer l'acide benzoïque par l'échantillon et reprendre la même procédure. Expérimentalement, on mesure l'augmentation de température (ΔT) produite par la combustion d'une masse m de l'échantillon. Connaissant la capacité calorifique du calorimètre, on est capable de déterminer l'énergie de combustion issue de cette substance.

Au temps $t = 0$, on démarre le chronomètre et on note la température de l'eau dans la cuve. Un thermomètre à affichage numérique permet de lire cette température avec une précision de un centième de degré. Une fois la température stabilisée, on procède à la mise à feu. Une table traçante permet de suivre l'évolution de la température au cours du temps. La température augmente rapidement.

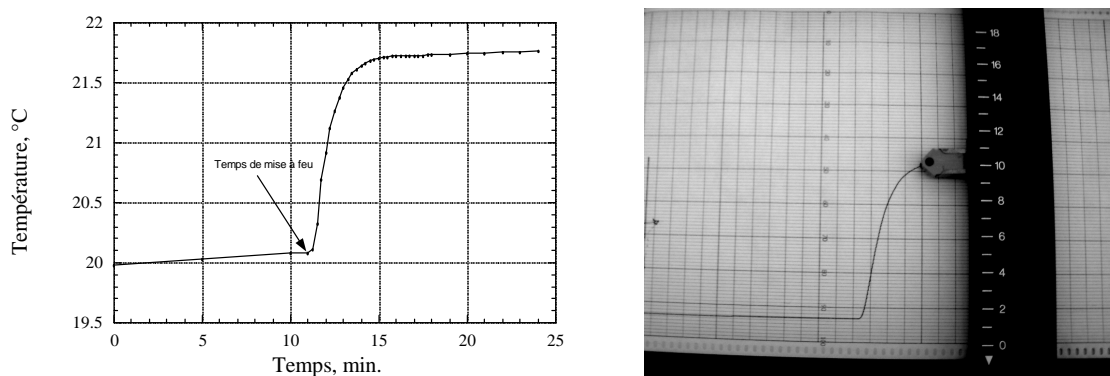


Figure 2-D : Schéma et photo du thermogramme d'une combustion complète. Le thermogramme se divise en 3 parties : A- la préperiode : temps durant lequel les différentes parties (vase, eau...) atteignent l'équilibre thermique; B- la réaction : temps durant lequel l'échantillon brûle; C- la postperiode : temps durant lequel le système retrouve son équilibre.

Équation 5-D : Etat d'équilibre lors de la combustion de l'échantillon

$$Q_{\text{éch}} + Q_{\text{abs}} + Q_{\text{fil}} = 0$$

$Q_{\text{éch}}$: chaleur dégagée par la combustion de l'échantillon (kJ)

Q_{abs} : chaleur absorbée par le système (kJ)

Q_{fil} : chaleur absorbée par le fil à combustion (kJ)

Équation 6-D : la chaleur de combustion de l'échantillon ($\Delta H_{\text{éch}}$)

$$m_{\text{éch}} \times \Delta H_{\text{éch}} = (m_{\text{eau}} + E) \times \Delta T \times C_{p_{\text{eau}}} - m_{\text{fil}} \times \Delta H_{\text{fil}}$$

$m_{\text{éch}}$: masse de l'échantillon (g)

$\Delta H_{\text{éch}}$: chaleur de combustion de l'échantillon

m_{eau} : masse d'eau introduite dans le vase Dewar (425 g)

E : capacité calorifique du calorimètre (g)

ΔT : variation de température

$C_{p_{\text{eau}}}$: capacité thermique massique de l'eau $4,184 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$

m_{fil} : masse du fil à combustion (g)

ΔH_{fil} : chaleur de combustion du fil à combustion : $5,857 \text{ kJ g}^{-1}$

Connaissant la masse de la pastille ($m_{\text{éch}}$) de matière végétale introduite dans la coupelle, il est aisé de calculer la chaleur de combustion de l'échantillon ($\Delta H_{\text{éch}}$).

Annexe E : Comparaison de méthodes pour estimer le contenu en LIG et en TSC dans le résidu pariétal

Dans cette annexe, nous développons une méthode micro-calorimétrique permettant d'estimer le contenu en lignines et en (hémi)celluloses dans le résidu pariétal. Nous comparons nos résultats avec ceux obtenus en appliquant la méthode basée sur le contenu carboné (Poorter and Villar 1997).

La composition biochimique du résidu pariétal

Les méthodes pour déterminer la concentration en lignine sont généralement fastidieuses, elles nécessitent l'utilisation de composés chimiques agressifs et interfèrent souvent avec d'autres composés contenus dans le matériel végétal. De plus, les lignines sont des composés très divers, plusieurs calibrations (Morrison 1972) doivent être réalisées (en utilisant des standards différents pour chaque espèce) ce qui rend les comparaisons extrêmement délicates et coûteuses. Comme il n'existe pas de méthode simple pour obtenir de la lignine pure, nous avons choisit de déterminer le contenu en lignine de façon rapide et simple, bien que sans doute assez peu précises. La première méthode est basée sur la teneur en carbone de chaque constituant de R3, la deuxième méthode est basée sur la chaleur de combustion de chaque constituant de R3. Ces deux méthodes sont basées sur le fait que :

Le résidu pariétal (R3, voir **Annexe F** pour l'obtention de ce résidu) est essentiellement constitué de sucres structuraux (*TSC*), de lignines (*LIG*), de protéines insolubles (qui ont précipité durant la première extraction, *PROT*) et de minéraux (*MIN*).

Estimation des lignines par la méthode du contenu en carbone

Les concentrations en sucres structuraux (*TSC*) et en lignines (*LIG*) sont calculées en partant du principe que les *LIG* contiennent $0,64 \text{ g.g}^{-1}$ de C, les *TSC* $0,44 \text{ g.g}^{-1}$ (Fengel and Wegener 1989) et les *PROT* en contiennent: $0,53 \text{ g.g}^{-1}$ (Poorter and Villar 1997). Après pesée du résidu pariétal (W_{R3}), le carbone total (C_{R3}) et l'azote total (N_{R3}) de ce résidu sont déterminés par analyse élémentaire.

La masse du résidu R3 est égale à la somme des masses des *TSC*, *LIG*, *PROT* et *MIN* contenus dans R3 :

$$W_{R3} = W_{PROT} + W_{LIG} + W_{TSC} + W_{MIN}$$

La quantité de carbone du résidu R3 est égale à la somme des quantités de carbone de *TSC*, *LIG*, *PROT* et *MIN* contenus dans R3 :

$$C_{R3} \times W_{R3} = C_{PROT} \times W_{PROT} + C_{LIG} \times W_{LIG} + C_{TSC} \times W_{TSC}$$

En combinant ces deux équations on obtient :

Équation 7-E : Calcul de la masse des LIG contenues dans R3 par la méthode du contenu en C

$$W_{LIG} = \frac{C_{R3} \times W_{R3} - C_{PROT} \times W_{PROT} - C_{TSC} \times (W_{R3} - W_{PROT} - W_{MIN})}{C_{LIG} - C_{TSC}}$$

W_{R3} , W_{PROT} , W_{LIG} et W_{TSC} : masses de *PROT*, *LIG* et *TSC* dans la matière végétale (g)

C_{R3} , C_{PROT} , C_{LIG} , C_{TSC} : teneurs en carbone de *R3*, *PROT*, *LIG* et *TSC* (g g⁻¹)

La calcination du résidu pariétal permet de déterminer la masse de cendre de celui-ci (W_{min}). La masse de la fraction protéique (W_{prot}) du résidu est calculée en multipliant la concentration en N totale du résidu pariétal (N_{R3}) par 6,25 (Poorter and Villar 1997). Le contenu en *TSC* est ensuite calculé à partir de W_{lig} connaissant la masse initiale de R3.

Estimation des lignines par la méthode de la chaleur de combustion

Suivant la proportion de *LIG* (composés coûteux) et la proportion *TSC* (composés peu coûteux), l'énergie contenue dans le résidu pariétal n'est pas la même. Les chaleurs de combustion des *TSC*, *LIG* et *PROT* sont déterminées à partir de "standards" (cellulose en poudre microcristalline, taille des particules 20 µm; lignine hydrolytique et albumine bovine, respectivement). Connaissant la chaleur de combustion et la masse du résidu pariétal (W_{R3}), la contribution de chacun de ces trois composés au résidu pariétal peut facilement être calculée.

Une fois séché et pesé, un échantillon de 100 mg du résidu *R3* est brûlé dans une bombe calorimétrique (1425, semi micro bomb calorimeter, Parr, Illinois, USA) afin de déterminer sa chaleur de combustion (ΔH_{R3} , kJ g^{-1} , **Annexe D**). Les chaleurs de combustion obtenues pour les standards sont : $22,7 \text{ kJ g}^{-1}$ pour *LIG* ; $16,9 \text{ kJ g}^{-1}$ pour *TSC* et $22,52 \text{ kJ g}^{-1}$ pour *PROT*.

La masse du résidu *R3* est égale à la somme des masses des *TSC*, *LIG*, *PROT* et *MIN* dans *R3* :

$$W_{R3} = W_{PROT} + W_{LIG} + W_{TSC} + W_{MIN}$$

La quantité de chaleur contenue dans le résidu *R3* est égale à la somme des quantités de chaleurs de *TSC*, *LIG*, *PROT* et *MIN* dans *R3* :

$$\Delta H_{R3} \times W_{R3} = \Delta H_{PROT} \times W_{PROT} + \Delta H_{LIG} \times W_{LIG} + \Delta H_{TSC} \times W_{TSC}$$

En combinant ces deux équations on obtient :

Équation 8-E : Calcul de la masse de LIG contenue dans R3 par calorimétrie

$$W_{LIG} = \frac{\Delta H_{R3} \times W_{R3} - \Delta H_{PROT} \times W_{PROT} - \Delta H_{TSC} \times (W_{R3} - W_{PROT} - W_{MIN})}{\Delta H_{LIG} - \Delta H_{TSC}}$$

W_{R3} , W_{PROT} , W_{LIG} et W_{TSC} : masses de *R3*, *PROT*, *LIG* et *TSC* dans la matière végétale (g)

ΔH_{R3} , ΔH_{PROT} , ΔH_{TSC} , ΔH_{LIG} : chaleur de combustion de *R3*, *PROT*, *LIG* et *TSC* (kJ g^{-1})

Résultats

Les valeurs obtenues avec les deux méthodes sont bien corrélées ($r^2=0,69$ pour l'estimation des *LIG* et $r^2 = 0,65$ pour l'estimation des *TSC*; $p < 0,001$). Toutefois, la méthode calorimétrique double l'estimation du contenu en *LIG* par rapport à la méthode du contenu carboné ($y_1=1,45$) et sous-estime le contenu en *TSC* de 20% ($y_2=0,85$).

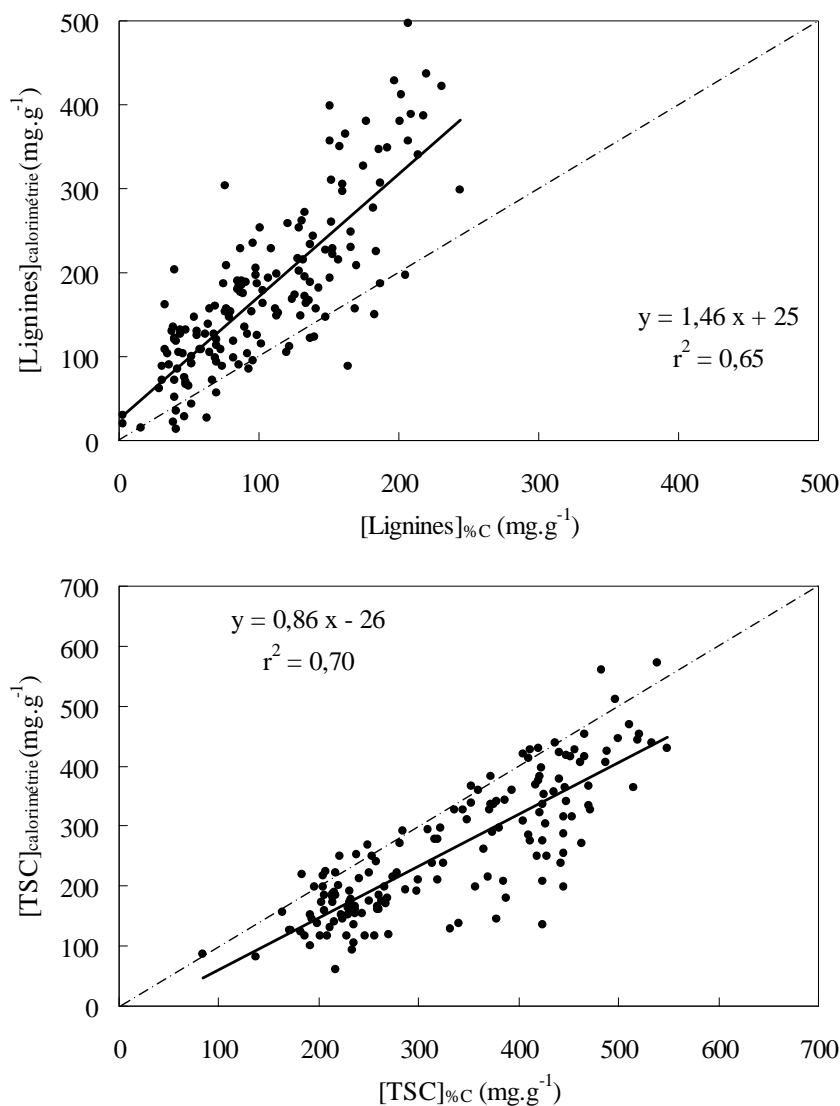


Figure 3-E : Les résultats des régressions linéaires entre les valeurs obtenues par la méthode de Poorter et les celles obtenues par calorimétrie pour l'estimation du contenu en lignine (en haut) et en TSC (en bas). Sur chaque graphique sont représentés les coefficients de la droite de régression avec le coefficient de corrélation. La bissectrice est tracée en trait discontinu, elle sert de référence.

La corrélation entre ces deux méthodes dépend des valeurs standard affectées aux chaleurs de combustion des lignines, celluloses, et protéines. Contrairement aux protéines et aux sucres structuraux, les lignines sont des composés très diversifiés, de ce fait leurs teneurs en carbone et leurs chaleurs de combustion sont très variables. La lignine hydrolytique utilisée dans la méthode calorimétrique ne correspond pas à une teneur en carbone $0,64 \text{ g g}^{-1}$ appliquée dans la méthode de Poorter, mais à une teneur de $0,59 \text{ g g}^{-1}$ (dosé par analyse élémentaire). Ceci revient à dire que nous n'avons pas utilisé le même standard entre ces deux méthodes. Afin de rendre ces deux méthodes comparables nous appliquons une correction : en changeant la valeur de la chaleur de combustion affectée à la lignine de $24,88 \text{ kJ g}^{-1}$ ($22,7 \times 0,64 / 0,59$).

Avec cette valeur corrigée de chaleur de combustion pour la lignine, les coefficients directeurs s'approchent de 1 pour les deux relations, ($Y_3 = 1.01$ pour les LIG et $y_4 = 1.07$ pour les TSC). Les différences de valeur entre les deux méthodes sont de l'ordre de 7% pour l'estimation des LIG et de 9% pour l'estimation des TSC.

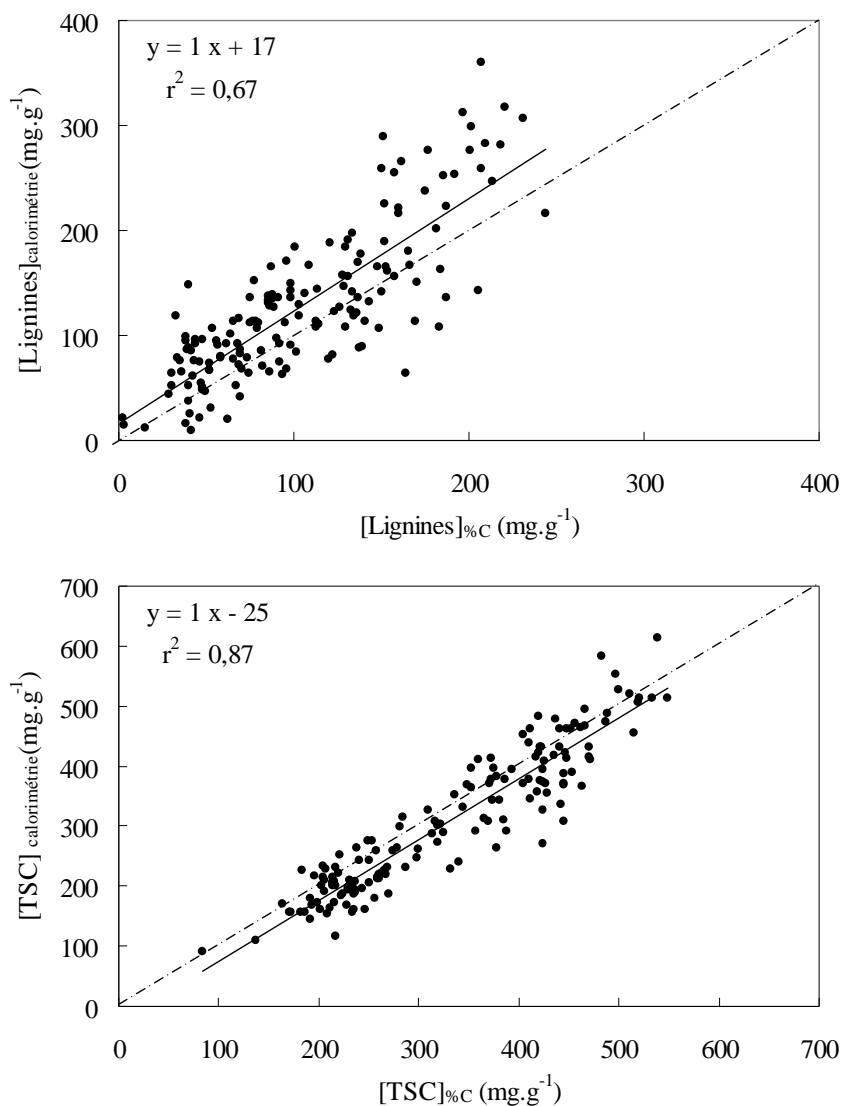


Figure 4-E : Les résultats des régressions linéaires entre les valeurs obtenues par la méthode de Poorter et les celles obtenues par calorimétrie (après correction de la chaleur de combustion des lignines) pour l'estimation du contenu en lignine (en haut) et en TSC (en bas). Sur chaque graphique sont représentés les coefficients de la droite de régression avec le coefficient de corrélation. La bissectrice est tracée en trait discontinu, elle sert de référence.

Il est ainsi possible d'ajuster la corrélation entre ces deux méthodes sur la bissectrice (pente=1). C'est en appliquant une chaleur de combustion de 27 kJ g^{-1} pour les lignines que les résultats obtenus avec les deux méthodes corréleront le mieux.

Annexe F : Protocole pour déterminer la composition biochimique du matériel végétal

Pour toutes les analyses de composition biochimique, le matériel végétal est préalablement séché à l'étuve à 50°C pendant 72 h puis finement broyé (broyeur à bille).

Le contenu en minéraux (MIN) est assimilé au contenu en cendres. Les cendres sont déterminées par gravimétrie après calcination (au four à 550°C pendant 5h) de 150 mg de matériel végétal.

Le carbone total C_{tot} et l'azote total N_{tot} sont déterminés à partir de 1mg de matière sèche et sont dosés par un micro analyseur carbone/azote couplé à un spectromètre de masse (NCS 2500, Thermoquest, Italie).

Les échantillons de matière sèche (broyés et homogénéisés) sont conservés à l'étuve à 50°C afin de minimiser l'hydrométrie et qu'elle soit comparable pour chacun des échantillons. La pesée est ensuite effectuée dans des petites coupelles d'étain sur une balance sensible au mg. Chaque échantillon passe dans une première colonne de combustion en présence d'oxygène. Les gaz produits (CO_2 , H_2O et oxydes d'azotes) sont entraînés par un flux continu d'hélium dans une colonne de réaction remplie de cuivre rouge. Un piège à eau à la sortie du four assure l'élimination de la vapeur d'eau. CO_2 et N_2 sont ensuite séparés par chromatographie en phase gazeuse avant d'être dosés par un catharomètre, en référence à des standards de teneur élémentaire certifiée.

Le contenu en protéines (PROT) est calculé à partir de N_{tot} , en considérant qu'il y a en moyenne 0,16 gramme de N par gramme de protéine.

$$PROT = \frac{N_{tot}}{0,16}$$

Extraction (voir schéma à la fin de l'Annexe F)

L'extraction est répétée sur deux échantillons indépendants pour avoir des répliqués. Un échantillon de 150 mg de matière végétale (broyé et homogénéisé) est extrait à deux reprises dans un mélange de 10 mL de méthanol, chloroforme (2/2: v/v) selon la méthode de Bligh and

Dyer (1959). L'échantillon et le solvant sont bien mélangés (dans des tubes à essai, ou erlenmeyer) puis reposent 30mn à température ambiante, afin de permettre l'extraction complète. L'addition d'eau dans le mélange méthanol chloroforme (1/2/2: v/v/v) produit deux phases, de part et d'autre du résidu.



Figure 5-F : Photographie des 3 phases issues de l'extraction eau, méthanol, chloroforme (1/2/2: v/v/v). La phase supérieure (a) correspond à la phase méthanolique (elle contient les sucres solubles (glucose, sucrose soluble, fructose...) et les composés phénoliques solubles.). La phase chloroformique (c) (en bas) contient les composés lipidiques (phospholipides, galactolipides et stérols).. Le résidu (b) entre les deux phases.

Les deux phases et le résidu sont ensuite filtrés sur creuset filtrant en borosilicate (DURAN®, porosité 3 correspondant à un diamètre de pores entre 16 et 40 μ m). Le filtrat (S1) contient les deux phases : la phase méthanol/eau au dessus ($d = 0,79$ pour le méthanol), la phase chloroformique au dessous ($d = 1,47$). Le résidu (R1) reste dans le creuset filtrant.



Figure 6-F : Photographie de la filtration sous vide sur creuset filtrant du mélange eau, méthanol, chloroforme (1/2/2: v/v/v).

La phase méthanolique est prélevée du filtrat avec une pipette Pasteur, cette phase est conservée au congélateur à -20°C dans l'obscurité jusqu'aux analyses. Cette phase contient les sucres solubles (glucose, sucrose soluble, fructane...) et les composés phénoliques solubles.

Les composés phénoliques solubles sont dosés par spectrophotométrie avec le réactif de Folin-Ciocalteus selon la méthode de (Singleton and Rossi 1965). Sur une prise d'essai de $50\mu\text{L}$ de la phase méthanolique sont ajoutés $475\mu\text{L}$ de réactif de Folin (0,25 N) puis $475\mu\text{L}$ de NaCO_3 (1M). La solution repose 15 mn au bain marie à 40°C . Une solution de coumarine est utilisée comme standard, dont la gamme s'échelonne de 0 à $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. L'absorbance est lue à 724 nm . Le dosage des composés phénoliques, nécessite une lyophilisation préalable de la matière végétale.

La phase chloroformique contient les lipides (phospholipides, galactolipides et stérols). Cette phase est évaporée sous atmosphère d'azote à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le contenu lipidique est déterminé gravimétriquement à partir du résidu (R2) issu de l'évaporation.



Figure 7-F : Photographie de l'extraction sous atmosphère d'azote avec évaporateur rotatif de la phase chloroformique (issue l'extraction de la matière végétale avec le mélange eau, méthanol, chloroforme, 1/2/2: v/v/v).

Le résidu R1, constitué de débris cellulaires est remis en suspension avec HCl à 3%, la suspension bout 4h à 100°C . Cette hydrolyse acide décompose l'amidon, le reste de fructane, de pectine et une certaine partie des (hémi)celluloses. La suspension est ensuite filtrée sur creuset filtrant en borosilicate (DURAN®, porosité 3 correspondant au diamètre des pores de 16 à

40 μ m). Le résidu R3 ainsi obtenu ne contient plus de sucres insolubles, il est constitué uniquement d' (hemi)celluloses, de lignines et de protéines insolubles qui n'ont pas précipitées durant la première extraction. R3 est le résidu pariétal.

Les protéines insolubles sont calculées en divisant le N_{tot} du résidu R3 par 0,16 (Poorter and Villar 1997).

Les contenus en lignines et en (héli)celluloses sont déterminés à partir de la teneur en carbone de R3 (analyse élémentaire) et des teneurs en carbone des protéines (0,53 g g⁻¹), des lignines (0,64 g g⁻¹) et des (héli)celluloses (0,44 g g⁻¹, Poorter and Villar 1997). Les calculs sont détaillés en **Annexe E**.

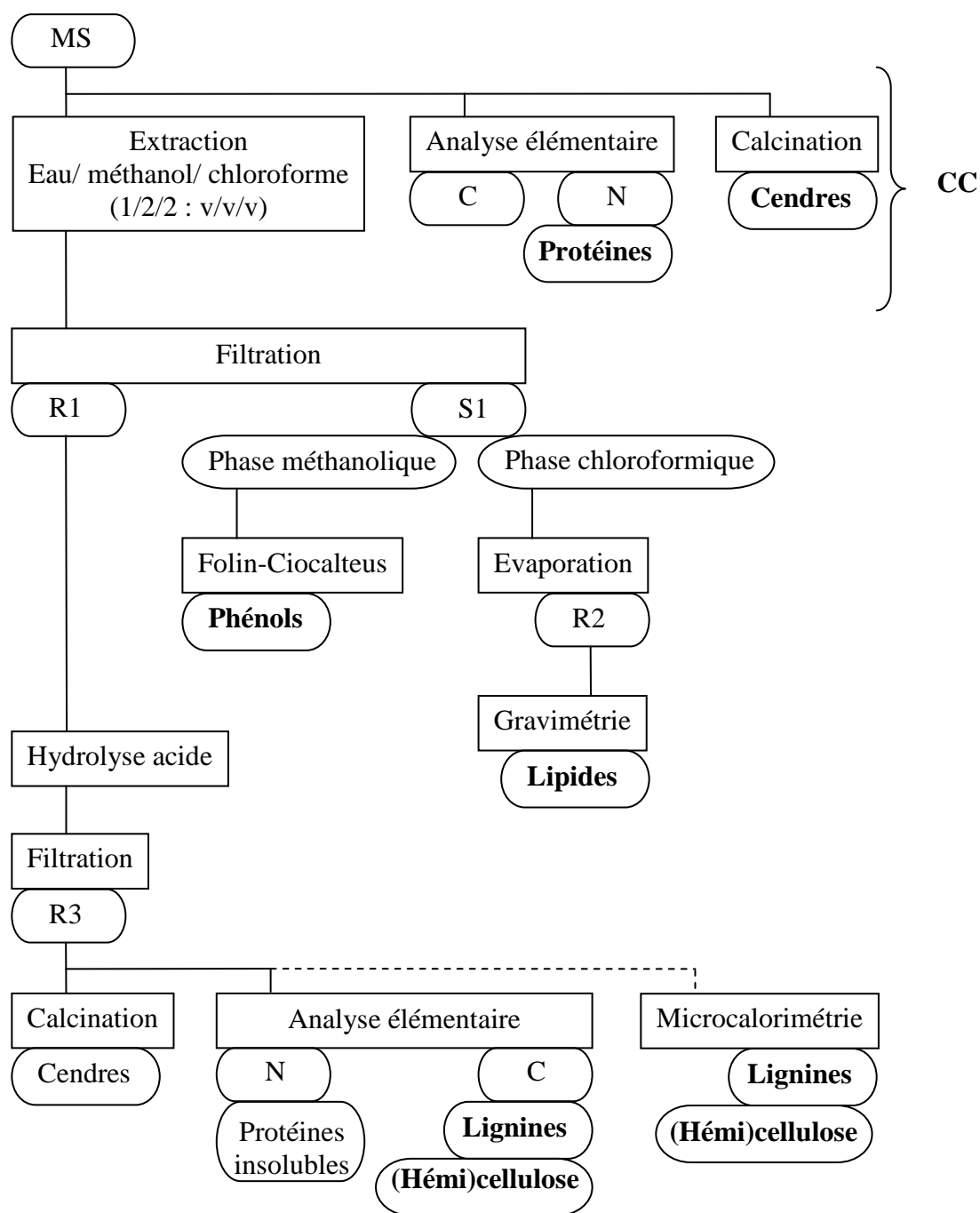


Figure 8-F : Schéma du protocole expérimental pour déterminer la composition biochimique du matériel végétal. La description de ce schéma est présentée en Annexe F. MS : matière sèche ; C et N contenu en carbone déterminés par analyse élémentaire ; R1, R2 et R3 résidus obtenus à l'issue de filtration ou évaporation ; S1 : substrat issu de la filtration.

Références Bibliographiques des Annexes

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37:911-917

Fengel D, Wegener G (1989) Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Berlin

Morrison IM (1972) Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. Journal of Sciences Food Agriculture 23:1463-1469

Poorter H, Villar R (1997) The fate of the acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs. In: Plant Resource Allocation. Academic Press, pp 39-72

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16:144-158

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<i>Figure 1-D</i> : Photographie de la micro bombe calorimétrique du calorimètre de combustion Semi-Micro 1425 de Parr Instrument.	1-D
<i>Figure 2-D</i> : Schéma et photo du thermogramme d'une combustion complète.	4-D
<i>Figure 3-E</i> : Régressions linéaires entre les valeurs obtenues par la méthode de Poorter et les celles obtenues par calorimétrie pour l'estimation du contenu en lignine et en TSC.	4-E
<i>Figure 4-E</i> : Régressions linéaires entre les valeurs obtenues par la méthode de Poorter et les celles obtenues par calorimétrie pour l'estimation du contenu en lignine et en TSC, après correction de la chaleur de combustion des lignines)	5-E
<i>Figure 5-F</i> : Photographie des 3 phases issues de l'extraction eau, méthanol, chloroforme (1/2/2: v/v/v).	2-F
<i>Figure 6-F</i> : Photographie de la filtration sous vide sur creuset filtrant du mélange eau, méthanol, chloroforme (1/2/2: v/v/v).	2-F
<i>Figure 7-F</i> : Photographie de l'extraction sous atmosphère d'azote avec évaporateur rotatif de la phase chloroformique	3-F
<i>Figure 8-F</i> : Schéma du protocole expérimental pour déterminer la composition biochimique du matériel végétal.....	5-F

Equations

<i>Équation 1-D</i> : Combustion complète de l'acide benzoïque	2-D
<i>Équation 2-D</i> : Quantité de chaleur produite par la combustion de l'acide benzoïque	2-D
<i>Équation 3-D</i> : Quantité de chaleur absorbée par le calorimètre et ses accessoires.....	3-D
<i>Équation 4-D</i> : Calcul de la capacité calorifique du calorimètre	3-D
<i>Équation 5-D</i> : Etat d'équilibre lors de la combustion de l'échantillon.....	4-D
<i>Équation 6-D</i> : Calcul de la chaleur de combustion de l'échantillon (ΔH_{ech})	4-D
<i>Équation 7-E</i> : Calcul de la masse de LIG dans R3 par la méthode du contenu en C.....	2-E
<i>Équation 8-E</i> : Calcul de la masse de LIG dans R3 par calorimétrie	3-E

Interspecific variability and plasticity of the cost associated to the leaf area renewal in forest species growing in natural regeneration

One of the components of shade tolerance resides in the ability of saplings to reduce carbon loss by minimising respiratory and by optimising light interception and photosynthesis. Thus it must exist a compromise between the reduction in respiratory losses, increase in photosynthetic activity and development of their assimilatory area. We were interested more particularly in modulation of the cost associated to leaf area renewal (leaves and various structures necessary to their deployment) and we therefore characterized biochemical (construction cost, biochemical composition) and morphological (specific leaf area, biomass allocation) features which explain the interspecific differences and the plasticity of this cost.

The study was done *in situ* on saplings sampled in a large range of light environments making it possible to characterize the interspecific variability and the plasticity of the cost associated to the leaf area renewal. The species selected were contrasted from the point of view of their temperament, their architecture and their foliar morphology: nine species were selected in temperate forest (Moselle) and three in tropical forest (French Guyane). The light microclimate of each seedling was characterized by a numerical hemispherical photograph. The construction cost of each organ was calculated starting from its carbon content, and corroborated by its heat of combustion (microcalorimetry).

We observed a large interspecific variability and a large plasticity of the cost associated to the leaf area renewal. These costs do not reflect the temperament of species but their plasticity shows that the most tolerant species are most plastic. This plasticity is more due to morphologicals changes of the specific leaf area than to biochemical changes.

Keywords: *shade tolerance; construction cost; interspecific variability; plasticity; carbon balance.*

En sous-bois, la capacité des juvéniles installés à diminuer les pertes de carbone par respiration et à augmenter l'interception du rayonnement lumineux constitue une composante à part entière de leur aptitude à tolérer l'ombrage. Il doit donc exister un compromis entre la diminution des pertes respiratoires, l'augmentation de l'activité photosynthétique et le maintien de la surface assimilatrice. En s'intéressant plus particulièrement à la modulation du coût associé au déploiement des surfaces assimilatrices (feuilles et différentes structures nécessaires à leur déploiement) nous avons caractérisé les traits biochimiques (coût de construction, composition) et morphologiques (surface spécifique, allocation de biomasse) qui expliquent les différences interspécifiques et la plasticité de ce coût.

Ce travail a été réalisé *in situ* sur des juvéniles installés dans des conditions d'ombrage plus ou moins intense permettant de caractériser la variabilité interspécifique et la plasticité du coût de mise en place de la surface assimilatrice. Les espèces retenues étaient contrastées du point de vue de leur tempérament, de leur architecture et de leur morphologie foliaire: neuf espèces ont été choisies en forêt tempérée (Moselle) et trois en forêt tropicale (Guyane française). Le microclimat lumineux de chaque plant a été caractérisé par une photographie hémisphérique numérique. Le coût de construction de chaque organe a été déterminé à partir de sa teneur en carbone, et corroboré par sa chaleur de combustion (microcalorimétrie).

Nous observons une grande variabilité interspécifique et une forte plasticité du coût associé au déploiement de la surface assimilatrice. Ces coûts ne reflètent pas le tempérament des espèces, en revanche, leur plasticité montre que les espèces les plus tolérantes sont les plus plastiques. Cette plasticité est plus due à des modifications morphologiques de la surface spécifique des feuilles qu'à des modifications de leur contenu biochimiques.

Mots clefs : *tolérance à l'ombrage ; coût de construction ; variabilité interspécifique ; plasticité ; bilan de carbone.*