

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles / Université libre de Bruxelles Institutional Repository **Thèse de doctorat/ PhD Thesis** 

#### **Citation APA:**

Havaux, M. C. (1987). Emission de lumière et de chaleur par les feuilles végétales (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des sciences. Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/213488/3/20ceddb7-2c48-4e41-91d5-419cfd28278d.txt

#### (English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à

prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

# Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que : - Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;

- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;

- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

------ English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is

invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;

- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission. Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Physiologie Végétale

A 9

ÉMISSION DE LUMIÈRE ET DE CHALEUR PAR LES FEUILLES VÉGÉTALES

Mesure rapide des désordres physiologiques dans les plantes

par Michel HAVAUX

Thèse présentée pour l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur





Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Physiologie Végétale

## ÉMISSION DE LUMIÈRE ET DE CHALEUR PAR LES FEUILLES VÉGÉTALES

RV

Mesure rapide des désordres physiologiques dans les plantes

par Michel HAVAUX

Thèse présentée pour l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur

<u>Couverture</u>: photographie de l'émission de fluorescence chlorophyllienne de feuilles de géranium éclairées par une lumière bleue-verte (filtre SCHOTT BG18). La fluorescence a été détectée au moyen d'un filtre KODAK WRATTEN 70 et d'un film KODACOLOR 1000 ASA.

#### REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude envers les Professeurs R. Lannoye et S. Malkin pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire.

D'une manière générale, mes remerciements les plus vifs vont aussi à tous ceux avec qui j'ai collaboré ou qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans mon travail.

Je remercie également le Fonds National de la Recherche Scientifique qui, en m'octroyant plusieurs mandats, m'a permis d'effectuer mes recherches au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Libre de Bruxelles et le Stiftung Volkswagenwerk dont la bourse postdoctorale qu'il m'a accordée m'a permis de travailler pendant 2 ans au Département de Biochimie de l'Institut Weizmann des Sciences (Israël).

Les résultats présentés dans cette thèse n'auraient pu être obtenus sans l'aide financière du U.S.-Israel Binational Agricultural Research and Development Foundation (BARD, grant n° I-338-81), du FRFC (contrat n° 2.4519.84) et de la Commission des Communautés Européennes (Non Nuclear Energy Research and Development Program, contract n° EN3B-0034-B et AGRIMED, contrat n° VI/4741/84-F(VIPF4/501).

## TABLE DES MATIÈRES

	Résumé	1
	I.	Introduction2
		A. Fluorescence
		B. Luminescence13
		C. Émission de chaleur15
		D. Diagnostic rapide de l'état physiolo-
		que des plantes24
3	II.	Stress hydrique27
	III.	Hautes températures48
	IV.	Basses températures
	۷.	Lumière
	VI.	Conclusions
	VII.	Références citées
	VIII.	Liste des publications
		personnelles

#### RÉSUMÉ

Grâce aux pigments qu'elles contiennent, les feuilles végétales ont la capacité d'absorber l'énergie lumineuse. L'excitation des molécules-pigments suite à l'absorption de photons résulte en l'émission par les feuilles de toute une série de signaux liés à la dissipation de l'énergie d'excitation absorbée. Certains de ces signaux, tels la fluorescence et la luminescence de la chlorophylle ou chaleur, sont facilement et rapidement l'émission de mesurables in vivo par différentes techniques biophysiques (fluorimétrie, photoacoustique,...) qui sont décrites dans le premier chapitre de cette thèse. Il est montré que les signaux lumineux, thermiques ou acoustiques mesurés au moyen de ces activités techniques renseignent directement sur les photochimiques des chloroplastes in vivo et peuvent servir de univoques de l'état fonctionnel des membranes marqueurs chloroplastiques.

caractéristique importante de ces Cette signaux biophysiques peut être utilisée en pratique, comme outil de diagnostic, pour détecter rapidement et de manière non destructive l'apparition de conditions de stress (physicochimiques) dans la plante. Les chapitres II à V montrent exemples l'environnement quelques de contraintes de (sécheresse, chaleur ou froid, basses ou hautes intensités lumineuses) dont les effets sur la physiologie de diverses plantes cultivées sont suivis in situ par des mesures de la fluorescence chlorophyllienne et des signaux photoacoustiques. Des mesures simultanées ou combinées à l'aide des diverses techniques présentées dans cette thèse permettent d'élucider les mécanismes complexes de contrôle de la photosynthèse par les facteurs de l'environnement. De plus, à un niveau plus fondamental, l'étude in vivo de l'activité photochimique des chloroplastes en conditions de stress constitue une approche originale pour confirmer ou, le cas échéant, infirmer les modèles proposés pour expliquer les réactions photochimiques primaires de la photosynthèse.

Une des applications les plus intéressantes de la mesure des signaux lumineux et photoacoustiques des feuilles est la possibilité d'estimer facilement la résistance relative de génotypes de plantes cultivées vis-à-vis des stress de l'environnement. Quelques tests rapides et efficaces de criblage sont présentés.

#### I.INTRODUCTION

Les feuilles végétales contiennent divers pigments (surtout des chlorophylles et des caroténoïdes) qui ont la propriété d'absorber l'énergie lumineuse. L'excitation de ces pigments suite à l'absorption d'un photon est suivie d'une désexcitation qui peut prendre quatre formes différentes (Govindjee & Govindjee, 1975) (Fig. l):

\* <u>transfert</u> de l'énergie absorbée vers une molécule-pigment voisine à l'intérieur des antennes du photosystème (PS) I ou II. Cette énergie pourra finalement être transférée aux chlorophylles des centres réactionnels. Il faut remarquer que le transfert d'énergie peut également se faire entre des pigments antennes du PS II et du PS I ("spillover") ou entre antennes de deux centres réactionnels différents du PS II ("grouping").

\* ré-émission d'un photon (<u>fluorescence</u> et phosphorescence).

\* désexcitation non radiative (émission de chaleur).

\* dans le cas des chlorophylles des centres réactionnels, perte d'un électron vers la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons (<u>activité photochimique</u>). Au cours du processus de séparation de charges, un pigment spécialisé du centre réactionnel (P<sub>680</sub> pour le PS II, P<sub>700</sub> pour le PS I) donne un électron excité à un accepteur primaire



<u>Fig.l</u>. Processus d'excitation et de désexcitation des molécules de chlorophylle a dans les feuilles végétales.

(Q<sub>A</sub> pour le PS II). Le pigment ainsi oxydé est ensuite réduit par un électron venant d'un donneur appelé Z (dans le cas du PS II). Cet électron provient originellement de l'oxydation de l'eau par un processus très complexe impliquant plusieurs étapes intermédiaires (Renger & Govindjee, 1985; Badger, 1985; Etienne, 1986). On a donc:

> Z P<sub>680</sub> Q<sub>A</sub> + h $\gamma \rightarrow$  Z P<sub>680</sub><sup>\*</sup> Q<sub>A</sub> (excitation) Z P<sub>680</sub><sup>\*</sup> Q<sub>A</sub>  $\rightarrow$  Z P<sub>680</sub><sup>+</sup> Q<sub>A</sub><sup>-</sup> Z P<sub>680</sub><sup>+</sup> Q<sub>A</sub><sup>-</sup>  $\rightarrow$  Z<sup>+</sup> P<sub>680</sub> Q<sub>A</sub><sup>-</sup> (séparation de charges)

Les différentes voies de désexcitation des molécules de chlorophylle excitées dépendent l'une de l'autre. Si un des processus de désexcitation est rendu impossible, la dissipation d'énergie via les autres processus augmente. Ainsi, une augmentation de l'émission de chaleur ou de fluorescence indique une inhibition de la dissipation d'énergie par transfert ou photochimie. L'existence de ces diverses voies de dissipation de l'énergie d'excitation absorbée fait que la transformation de la lumière en énergie chimique libre par photosynthèse est loin de se réaliser avec un rendement quantique de 100%. Grosso modo, dans une feuille en conditions favorables, on peut estimer que la dissipation d'énergie se fait à raison d'environ 5% pour la fluorescence, 65% pour la chaleur et 25% pour la photochimie.

#### A. FLUORESCENCE

Aux températures physiologiques, ce sont les molécules de chlorophylle a du PS II qui sont responsables de la majeure partie de l'émission de fluorescence dans une feuille. Comme le montre la figure 2, qui présente un spectre d'émission de fluorescence d'une feuille de tabac, la fluorescence chlorophyllienne est une lumière rouge/rouge lointain. On peut observer deux maxima de fluorescence: un maximum aux environs de 685 nm correspondant à la fluorescence du PS II et un autre pic, plus petit et centré aux environs de 730 nm, attribué au PS I. Le spectre d'émission de fluorescence d'une feuille est sensiblement différent de celui que l'on peut mesurer dans une suspension de chloroplastes où le pic attribué au PS I est



Fig.2. Spectre d'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 25°C dans une feuille de tabac éclairée par une lumière à 440 nm.



<u>Fig.3</u>. Représentation schématique d'un fluorimètre simple permettant de mesurer in vivo la fluorescence de la chlorophylle émise par des feuilles intactes. beaucoup plus petit par rapport au pic du PS II (Goedheer, 1972). Cela est dû au fait qu'un tissu végétal présente une très forte dispersion de la lumière et que la fluorescence chlorophyllienne aux environs de 685 nm est réabsorbée plus fortement que la fluorescence aux plus longues longueurs d'onde (Percival & Baker, 1985). Il convient de garder à l'esprit que des changements dans les caractéristiques de l'émission de fluorescence in vivo (par exemple, dépendance vis-à-vis de la longueur d'onde de la lumière d'excitation) peuvent dans certains cas résulter de différences dans les propriétés optiques des tissus végétaux plutôt que de l'appareil photochimique des membranes modifications de thylacoïdiennes. Ce problème peut être éliminé par des mesures "dynamiques" de la fluorescence chlorophyllienne (effet Kautsky, voir plus loin).

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne in vivo est relativement simple et consiste essentiellement à séparer la fluorescence (lumière rouge) relativement faible de la lumière d'excitation (en général, bleue-verte) de plus forte intensité au moyen d'un filtre adéquat (interférentiel ou passe-haut). La fluorescence peut être détectée au moyen d'une photodiode ou d'un tube photomultiplicateur. La figure 3 montre une représentation schématique d'un fluorimètre simple permettant de faire des mesures de fluorescence chlorophyllienne dans des feuilles intactes. Pour plus d'informations, on peut se référer aux articles de Schreiber (1983) et Malkin et al. (1981) (concernant le principe des mesures de fluorescence chlorophyllienne in vivo), de Schreiber et al. (1975), Melcarek et al. (1977), Ögren & Baker (1985) et Schreiber et al. (1986) (décrivant des fluorimètres miniaturisés et portables les utilisant nouvelles technologies des semiconducteurs) ou de Norrish et al. (1983) et Panneels et al. (1987) (pour le traitement par ordinateur des signaux de fluorescence).

Effet Kautsky. Aux environs de 1935, Kautsky & Hirsh (1934) et Kautsky & Eberlein (1939) ont fait une découverte qui fut d'abord considérée comme une curiosité de laboratoire mais qui se révéla ensuite être fondamentale pour la compréhension des processus photochimiques primaires de la photosynthèse. Ils ont observé que, lorsqu'un organisme photosynthétique est adapté à l'obscurité pendant un certain laps de temps (quelques minutes, par exemple) et est ensuite ramené à la lumière, le rendement de la fluorescence de la chlorophylle varie en fonction du temps suivant une cinétique relativement complexe. La figure 4 montre cet "effet Kautsky" induit dans une feuille de maïs adaptée pendant 30 min à l'obscurité. Au moment de l'illumination, la fluorescence augmente d'abord quasi instantanément jusqu'à un niveau initial (appelé 0). Puis elle augmente rapidement (dans l'intervalle d'environ l à 2 s) jusqu'à un niveau maximum (P). Ensuite, le rendement de la fluorescence chlorophyllienne décroît lentement (pendant quelques minutes) jusqu'à un état stationnaire (T) en passant généralement par un second maximum (M).

Ces changements transitoires de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne observés au cours d'une transition obscurité/lumière sont reliés à l'activation de toute une série de processus photosynthétiques qui peuvent ainsi être étudiés indirectement. Le niveau O de la fluorescence reflète la perte d'une partie de l'énergie absorbée par les molécules de chlorophylle a antennes avant qu'elles n'aient pu transférer l'énergie d'excitation vers le



<u>Fig.4</u>. Effet Kautsky: changements au cours du temps de l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle émise (à 25°C) par une feuille de maïs adaptée à l'obscurité et brusquement illuminée (au temps 0). 6

centre réactionnel (Krause & Weis, 1984; Briantais et al., 1986). Ce niveau O, qui correspond à un état où tous les accepteurs primaires d'électrons (QA) du PS II sont oxydés, des processus photochimiques. est donc indépendant L'augmentation rapide de fluorescence (phase OIDP) dépend principalement de l'état rédox de QA. Suivant l'hypothèse "classique" de Duysens et Sweers (1963), la réduction progressive de QA par l'activité du PS II augmente la probabilité de dissipation d'énergie par émission de fluorescence (et de chaleur), simplement parce que les possibilités de conversion photochimique diminuent. Lorsque le centre réactionnel est sous la forme Z+ P680 QA-, il ne peut plus effectuer d'autres séparations de charges: il est "fermé". Quand tous les QA sont réduits, tous les centres réactionnels sont "fermés" et la fluorescence est maximale. D'après Butler & Kitajima (1975a), c'est en fait une réaction "en retour" de ces centres réactionnels "fermés" vers les molécules de chlorophylle a antennes qui résulte en une augmentation de la fluorescence de ces dernières. En réalité, l'augmentation de la fluorescence de O vers P se fait suivant une cinétique plus ou moins sigmoïde. Le ralentissement de l'augmentation du rendement de la fluorescence chlorophyllienne visible au cours de la phase I-D est attribuée à une réoxydation transitoire des QA<sup>-</sup> par QB (l'accepteur secondaire d'électrons du PS II) (Briantais et al., 1986). Il convient d'insister sur le fait que la relation entre l'intensité de la fluorescence F et la concentration en QA- n'est pas linéaire. Il y a en fait une relation plus simple entre F et la quantité de centres PS II fonctionnels car F et l'activité photochimique sont complémentaires (Lavorel et al., 1986). La relation de complémentarité exacte est

 $\phi_p + \phi_f + \phi_d = 1$ 

où les  $\phi$  sont les rendements et les indices p, f et d représentent respectivement la photochimie, la fluorescence et les désexcitations non radiatives (par exemple, F=  $\phi_f$  I où I est l'intensité lumineuse). Malkin & Kok (1966) et Murata et al. (1966) démontrèrent pour la première fois que la surface 7

complémentaire (surface au dessus de la courbe d'induction ) est une mesure valable du nombre de centres du PS II actifs.

Quant à la décroissance lente de la fluorescence (phase PSMT), elle est attribuée à trois processus différents: 1) la réoxydation des QA<sup>-</sup> suite à l'activation du PS I et du cycle de Calvin (composante photochimique de l'extinction de la fluorescence, q<sub>0</sub>), 2) l'établissement du gradient de pH photoinduit dans les chloroplastes (qui, suivant un mécanisme encore inconnu, conduirait à une augmentation de la désactivation thermique des molécules de chlorophylle a excitées; cette composante de l'extinction de la fluorescence est qualifiée d'"énergétique", qE) et 3) le phénomène de transition état 1-état 2 au cours duquel la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes est modifiée au profit du PS I faiblement fluorescent (Krause & Weis, 1984; Briantais et al., 1986; Schreiber et al., 1986; Malkin et al., 1986a). La distribution d'énergie semble dépendre très fortement de la localisation des complexes LHCP ("Light Harvesting Chlorophyll a/b Protein Complexes") dans les membranes thylacoïdiennes (Fork & Satoh, 1986; Williams & 1987). Dans des conditions physiologiques, la Allen, phosphorylation des LHCP et leur redistribution entre le PS I et le PS II apparaissent être les principaux facteurs déterminant le contrôle de la distribution de l'énergie d'excitation au sein de l'appareil photochimique.

Dans certains cas particuliers, la phase lente PSMT de l'induction peut être compliquée par l'apparition d'une série d'oscillations (M1, M2, ...) dans le niveau de la fluorescence chlorophyllienne (Walker et al., 1983a et b; Sivak & Walker, 1985), un phénomène qui a été interprété en terme de régulation du transport d'électrons par les rapports ATP/ADP et NADPH/NADP (via leur effet sur les mécanismes d'extinction de la fluorescence, q<sub>0</sub> et q<sub>E</sub>). Ainsi, par exemple, un changement soudain de la concentration en CO2 de l'atmosphère entourant la feuille résulte en une modification brusque de la demande en ATP et NADPH par le cycle de Calvin de fixation du CO2, provoquant des oscillations spectaculaires du rendement de la fluorescence de la chlorophylle. Ce phénomène permet une approche nouvelle et intéressante pour l'étude des mécanismes complexes de

régulation qui déterminent les interactions entre les réactions claires et sombres de la photosynthèse.

<u>Fluorescence modulée</u>. Lorsque la lumière d'excitation est modulée en intensité à une certaine fréquence, la fluorescence chlorophyllienne est également modulée à la même fréquence et peut être détectée au moyen d'un système de détection synchrone. L'intérêt de la technique de fluorescence modulée est la possibilité d'étudier l'influence de diverses lumières non modulées (qui ne créent par par elles-mêmes de signaux <u>mesurés</u>, le système de détection synchrone n'enregistrant pas les signaux de fluorescence non modulés à la fréquence de référence) sur le rendement de la fluorescence créée par la lumière modulée. L'intensité de la fluorescence modulée  $\widetilde{F}$ (créée par une lumière modulée d'intensité i utilisée en combinaison avec une lumière non modulée d'intensité I) est

 $\widetilde{F}= \phi_f(I+i)i = \phi_f(I)i$  quand  $i \ll I$ 

En d'autres mots, l'intensité de la fluorescence modulée  $\widetilde{F}$  dépend de l'intensité de la lumière continue.

La technique de la fluorescence modulée est notamment utilisée pour examiner la distribution de l'énergie lumineuse absorbée entre les deux photosystèmes (en utilisant des lumières continues absorbées préférentiellement par l'un ou l'autre des deux photosystèmes, voir Chow et al. (1981), Malkin et al. (1986a), Havaux & Lannoye (1987), Havaux (1987b)) ainsi que pour obtenir des informations semi-quantitatives sur l'activité photochimique des chloroplastes in vivo (en utilisant des éclairs de lumière saturante, voir Quick & Horton (1984), Dietz et al. (1985), Schreiber et al. (1986)). Tout récemment, Schreiber et al. (1986) ont développé un tout nouveau type de fluorimètre modulé, qui tolère un rapport aussi élévé que 1/106 entre l'intensité de la lumière modulée et celle de la lumière saturante. Cet appareil utilise de courtes impulsions (1 µs) de lumière rouge (produite par une diode émettrice de lumière - LED) appliquées à une fréquence élevée (1,6 ou 100 KHz) et une photodiode comme détecteur. La figure 5A présente une courbe de fluorescence modulée obtenue au moyen de ce type de fluorimètre. L'application d'éclairs de lumière saturante





Fig.5. A) Mesure de la fluorescence modulée de la chlorophylle vivo au moyen du fluorimètre développé par Schreiber et al. in (1986) ("Pulse Amplitude Modulation" (PAM) fluorometer commercialisé par H. WALZ, Effeltrich, RFA). La fluorescence modulée (niveau Fo) est induite par une très faible lumière modulée L1. L'effet Kautsky (Fy) est créé par une lumière non modulée de plus forte intensité L2. L'imposition répétée d'éclairs de lumière saturante Ls permet de déterminer, tout au long de la courbe d'induction, le niveau maximum de la (F<sub>v</sub>)<sub>S</sub>. Le niveau (F<sub>v</sub>)<sub>max</sub> fluorescence modulée (le maximum des  $(F_v)_S$ ) est obtenu par l'application de L<sub>S</sub> sur un échantillon adapté à l'obscurité. qo et qE peuvent être calculées à partir des différents niveaux de fluorescence  $F_{o}$ ,  $F_{v}$ ,  $(F_{v})_{S}$  et  $(F_{v})_{max}$  (voir texte).

B) changements de la valeur de  $q_Q$  et de  $q_E$  au cours de la phase lente de l'induction de la fluorescence chlorophyllienne (de P à T) calculés à partir des données de la figure 5A.

10

(induisant une augmentation transitoire du rendement de la fluorescence jusqu'au niveau maximum  $(F_v)_s$  due à une réduction complète des QA) tout au long de la courbe d'induction permet de mesurer en continu la composante photochimique de la décroissance de fluorescence QP  $(=((F_v)_s - F_v)/(F_v)_s)$ . De même, la différence entre le niveau maximum de fluorescence d'un échantillon adapté à l'obscurité (F<sub>v</sub>)<sub>max</sub> avec celui obtenu pendant l'induction (F<sub>v</sub>)<sub>s</sub>, divisé par (F<sub>v</sub>)<sub>max</sub>, fournit une estimation de la composante non photochimique de la décroissance de la fluorescence (principalement qE). La figure 5B montre les changements au cours du temps de q<sub>O</sub> et q<sub>E</sub>, calculés à partir de la courbe d'induction de la fluorescence de la chlorophylle présentée à la figure 5A. Le potentiel de cette méthode sera illustré aux chapitres IID et IV.

Fluorescence à 77K. La mesure de la fluorescence chlorophyllienne dans un échantillon refroidi jusqu'à la température de l'azote liquide (77K) permet d'obtenir une "photographie" de l'état de l'appareil photochimique des chloroplastes à un moment donné. Un spectre d'émission de fluorescence à 77K permet de distinguer clairement 3 bandes à 685, 695 et 735 nm qui ont été attribuées respectivement à l'émission des LHCP, des pigments antennes du PS II et du PS I (Briantais et al., 1986). Les courbes d'induction de la fluorescence de la chlorophylle à 77K présentent une augmentation du niveau Fo jusqu'au niveau maximum (Fm) qui reflète la réduction de QA (la réoxydation de QA<sup>-</sup> étant bloquée à 77K) (Murata, 1968; Butler & Kitajima, 1975a). A 695 nm, le rapport  $(F_m-F_o)/F_m$  est proche de 0,8 pour toutes les espèces végétales en condition normale (c'est-à-dire pour des plantes non stressées (Björkman & Demmig (1987)). Demmig & Björkman (1987) ont démontré que, lorsque le PS II est détruit (par photoinhibition par exemple), (Fm-Fo)/Fm diminue et que cette diminution est linéairement corrélée à la réduction du rendement quantique de la production d'oxygène photosynthétique. Au moyen d'une technique différente, Moll (1987) est arrivé à une conclusion similaire, indiquant que la mesure du rapport (Fm-Fo)/Fm pourrait remplacer (pour les études en champ) les mesures plus difficiles et plus longues d'activité photosynthétique par analyse des échanges gazeux

(électrode de Clark, analyse du CO2 par infra-rouge (IRGA),...). La fluorescence variable (fluorescence au dessus de F<sub>o</sub>) à 735 nm est attribuée au transfert d'énergie d'excitation des centres réactionnels du PS II fermés vers le PS I via les antennes du PS II (mécanisme de "spillover"). Quant au niveau  $F_0$  à 735 nm, il reflète l'énergie venant de l'absorption directe des pigments du PS I et de la fraction d'énergie délivrée initiallement au PS I par les LHCP et les antennes du PS II. Ces relations ont été formulées par Butler & Kitajima (1975b) et Butler & Strasser (1977) dans leur "tripartite model" modifié par après par Stasser (1981) ("grouping model"). Les mesures de fluorescence à basse température ont été utilisées intensivement pour étudier les changements dans la distribution de l'énergie d'excitation entre le PS II et le PS I (voir par exemple, Satoh & Fork, 1983; Weis, 1984; Fork et al., 1986; Graf, 1987).

Il convient de remarquer que la réoxydation des QAêtre bloquée par d'autres moyens que les basses peut températures, en particulier par l'herbicide diuron (DCMU, 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurée). L'induction de la fluorescence chlorophyllienne en présence de DCMU ne reflète donc que la réduction de QA et permet de suivre la cinétique de la "fermeture" des pièges du PS II. Il a été fait mention plus haut du fait que l'intensité de la fluorescence et la concentration en QA<sup>-</sup> ne sont pas linéairement reliées. Si elles l'étaient, l'augmentation de fluorescence induite en présence de DCMU serait exponentielle alors qu'elle est sigmoïde. Ce caractère sigmoïde des courbes d'induction a été utilisé comme critère qualitatif du transfert d'énergie entre unités PS II (Jennings et al., 1980). La surface au dessus de la courbe de fluorescence est proportionnelle à la concentration en accepteurs d'électrons QA (Malkin & Kok, 1966). Cette surface peut être utilisée pour estimer la taille des unités photosynthétiques du PS II (nombre de molécules de chlorophylle par centre réactionnel) (Malkin et al., 1981).

<u>En bref</u>, les mesures de fluorescence de la chlorophylle in vivo fournissent de très nombreuses et très précieuses informations sur les réactions photochimiques primaires de la photosynthèse ainsi que sur d'autres processus photosynthétiques plus éloignés de l'acte primaire de capture de l'énergie lumineuse (cycle de Calvin). Toutefois, cette "richesse" du signal est également le principal défaut des mesures de fluorescence de la chlorophylle in vivo car leur interprétation est difficile et pas toujours univoque.

#### C. LUMINESCENCE

Un autre phénomène d'émission de lumière, qui peut persister pendant plusieurs minutes après l'extinction de la lumière d'excitation, a été observé dans les organismes photosynthétiques. Ce phénomène, découvert par Strehler & Arnold (1951), est appelé fluorescence retardée ou luminescence. Son origine est attribuée à une recombinaison de charges au niveau du PS II entre  $Q_A^-$  et Z<sup>+</sup> (Lavorel, 1975; Malkin, 1977):

### $Z^+ P_{680} Q_A^+ \longrightarrow Z P_{680} Q_A$ +luminescence

Il a été montré que l'intensité de la luminescence est dépendante de divers processus photosynthétiques, notamment le gradient de pH photoinduit, l'activité de photophosphorylation, le potentiel de membrane (Barber & Kraan, 1970; Wraight & Crofts, 1971; Evans & Crofts, 1973; Haveman & Lavorel, 1975), ainsi que la fluidité des membranes thylacoïdiennes (Ono & Murata, 1977; Havaux & Lannoye, 1983a).

La fluorescence retardée ne peut être mesurée qu'à l'obscurité après une période d'illumination car son spectre est identique à celui de la fluorescence immédiate mais son intensité est beaucoup plus faible. Des inductions de fluorescence retardée in vivo sont généralement obtenues à l'aide d'une lumière d'excitation pulsée (Lavorel, 1975; Malkin, 1977), par exemple dans un phosphoroscope du type Becquerel dont la représentation schématique est donnée à la figure 6. L'utilisation de deux disques rotatifs percés de fentes, placés devant la source lumineuse et le détecteur, permet de mesurer de façon répétitive la fluorescence retardée pendant les moments au cours desquels l'échantillon n'est pas éclairé. La figure 7 montre les courbes d'induction de la luminescence et de la fluorescence chlorophyllienne (mesurées simultanément) émises par une feuille de maïs. L'allure d'une courbe d'induction de la fluorescence retardée in vivo semble



<u>Fig.6</u>. Représentation schématique d'un phosphoroscope (du type Becquerel) permettant de mesurer l'intensité de la fluorescence retardée (luminescence) in vivo émise par une feuille intacte. f, filtre optique; o, obturateur.



<u>Fig.7</u>. Courbes d'induction (changements lents) de la fluorescence immédiate et retardée (luminescence, mesurée dans la gamme des ms) d'une feuille de maïs à 25°C.

être, à première vue, très semblable à celle d'une courbe de immédiate (montée rapide suivie fluorescence d'une décroissance lente). Une analyse détaillée des signaux révèle cependant qu'ils sont anti-parallèles (R. Strasser, Comm. Pers.). Récemment, Schreiber & Shliwa (1987) ont décrit un nouveau type d'appareil de mesure de luminescence, bon marché miniaturisé grâce à l'utilisation de composants et éléctroniques tels que des diodes émettrices de lumière (LED) et des photodiodes. Plusieurs techniques photographiques ont également été développées pour la détection visuelle de la luminescence (Sundbom & Björn, 1977; Ellenson & Amundson, 1982; Ellenson, 1985) ou de la fluorescence chlorophyllienne (Miles & Daniel, 1973; Gibbons & Smillie, 1980; Devlin et al., 1980). D'autre part, les techniques sophistiquées d'analyse d'images par ordinateurs ont tout récemment été appliquées au domaine de l'analyse de la fluorescence de la chlorophylle in vivo et pourraient s'avérer être très intéressantes pour la mise en évidence de différences spatiales de l'activité photosynthétique dans une feuille (Omasa et al., 1987).

### C. ÉMISSION DE CHALEUR

Quantitativement, la fluorescence de la chlorophylle est en réalité une voie tout à fait mineure de dissipation de l'énergie absorbée par les pigments foliaires. On estime qu'elle représente seulement 2 à 10 % de l'énergie dissipée. La plus grosse partie de l'énergie est en fait dissipée sous forme de chaleur. Cependant, jusqu'à présent, la dissipation d'énergie non radiative n'a été que très peu étudiée, essentiellement pour des raisons techniques. En effet, ce n'est que tout récemment que de nouvelles techniques (photoacoustique et radiométrie photothermique - pour revue récente voir Braslavsky (1986)) ont été développées en vue d'estimer la dissipation d'énergie thermique in vivo par des organismes photosynthétiques.

<u>Radiométrie photothermique</u>. Bults et al. (1982) ont montré que l'émission de chaleur par une feuille éclairée au moyen d'une lumière modulée en intensité peut être mesurée au moyen d'un détecteur infra-rouge. La figure 8 présente le schéma d'un appareil de radiométrie photothermique. Une autre possibilité est d'utiliser une cellule photoacoustique (voir



Fig.8. Représentation schématique d'un appareil de radiométrie photothermique.



Fig.9. Signal de radiométrie photothermique obtenu à partir d'une feuille de Brassica napus éclairée par une lumière rouge (650 nm) modulée à une fréquence de 2 Hz. S.L., lumière saturante non modulée.

plus loin) de manière à mesurer simultanément les signaux photoacoustiques et de radiométrie photothermique ("thermophone" de Kanstad et al. (1983)). Le signal obtenu à partir d'une feuille de Brassica napus, à l'aide de ce type d'appareil, est montré à la figure 9. L'adjonction d'une non modulée de forte intensité (saturante, lumière c'est-à-dire réduisant l'efficience photochimique à zéro) à la lumière modulée permet d'obtenir le niveau maximum d'émission de chaleur (modulée) par l'échantillon et la comparaison de ce niveau avec celui obtenu en abscence de la lumière saturante d'estimer le stockage d'énergie photochimique permet (c'est-à-dire, la fraction d'énergie d'excitation (modulée) stockée sous forme d'énergie chimique - dans ce cas-ci, 30%). Malheureusement, les signaux obtenus par environ radiométrie photothermique à partir de feuilles végétales sont très faibles et généralement entâchés par un bruit de fond important, réduisant considérablement le degré de précision des mesures et, par là, l'intérêt de la technique. Toutefois, l'avantage incontestable de cette technique par rapport à la photoacoustique est la possibilité de faire des mesures dans un système ouvert.

Spectroscopie photoacoustique. L'effet photoacoustique est conversion d'une lumière modulée en essentiellement la intensité en une émission périodique d'énergie thermique qui produit une onde de pression (c'est-à-dire un son) détectable par un microphone. Cet effet a été découvert par Bell en 1880. En essayant de développer un système de communication optique, Bell découvrit qu'une matière qui absorbe la lumière produit quand la un signal acoustique lumière est modulée périodiquement (Bell, 1880 et 1881). Cependant, pour plusieurs raisons (compréhension incomplète de l'origine de l'effet photoacoustique, manque de détecteurs sensibles et de bonnes sources lumineuses), l'effet photoacoustique fut rapidement oublié. Après 1970, il fut à nouveau utilisé pour l'étude des gaz, puis des solides et des liquides (Rosencwaig, 1980). A partir de 1980, la photoacoustique a été appliquée à l'étude de la photosynthèse par deux groupes de recherches pionniers dans ce domaine: l'un à l'Institut Weizmann des Sciences en Israël (sous la direction du Prof. S. Malkin) et l'autre au Centre de Recherche en Biophysique à Trois-Rivières au Canada (voir, entre autres, Carpentier et al., 1984 et 1985).

Malkin et collaborateurs (Bults et al., 1982; Canaani & 1984; Havaux et al., 1986a) étudièrent pour la Malkin, première fois les signaux photoacoustiques produits par des feuilles végétales au moyen d'un appareil tel que celui représenté schématiquement à la figure 10. Le matériel végétal (un petit disque de feuille d'environ l cm de diamètre) est éclairé par une lumière modulée en intensité à une fréquence généralement comprise entre 10 et 1000 Hz. Une partie de l'énergie lumineuse absorbée par les chloroplastes de la feuille est ré-émise sous forme de chaleur (qui est modulée à même fréquence que celle de la lumière d'excitation). la L'énergie thermique dissipée diffuse donc sous forme d'onde périodique des chloroplastes vers la paroi des cellules. Une mince couche d'air (dans les espaces extracellulaires) près de la paroi cellulaire est ainsi chauffée périodiquement et est soumise à un processus d'expansion/contraction périodique. Cela crée une onde de pression (un son) qui peut se propager dans la feuille et être transmise via l'épiderme (qui pourrait en quelque sorte jouer le même rôle que la peau d'un tambour) l'extérieur de la feuille. Cette onde acoustique à est détectée par un petit microphone sensible. Le signal acoustique brut est alors analysé par un amplificateur à détection synchrone ("lock-in amplifier") qui mesure son amplitude et sa phase (par rapport à la modulation de la lumière d'excitation). En fait, le signal photoacoustique peut être considéré comme un vecteur et, plutôt que mesurer sa phase et son amplitude, on peut mesurer sa projection sur les axes de référence (les deux composantes ainsi obtenues sont appelées quadrature et en-phase).

Un exemple typique de signal photoacoustique (quadrature et en-phase) produit par une feuille éclairée au moyen d'une lumière rouge modulée à l4 Hz est montré à la figure ll. Le signal photoacoustique produit par un échantillon de feuille est compliqué par le fait qu'il est photochimiquement actif. Une partie de la lumière absorbée est stockée sous forme d'énergie chimique. De plus, un organisme photosynthétique est caractérisé par des échanges gazeux liés à l'activité photosynthétique: il fixe du dioxide de carbone et dégage de l'oxygène. Dans le cas où la lumière est modulée, la



Fig.10. Représentation schématique d'un appareil de photoacoustique.



<u>Fig.ll</u>. Signal photoacoustique (quadrature et en-phase) émis par une feuille de tabac éclairée par une lumière rouge (640 nm) modulée à une fréquence de 14 Hz. S.L., lumière non modulée saturante. Q, quadrature; I, en-phase. production d'oxygène est également modulée. Cette production modulée d'oxygène photosynthétique résulte également en une onde acoustique qui, au même titre que le signal photothermique, est détectée par le microphone dans la cellule photoacoustique (Bults et al., 1982). Par le fait que ce sont des phénomènes beaucoup plus lents, impliquant une succession d'étapes enzymatiques, la fixation du CO2 et la (photo)respiration n'interfèrent pas avec l'effet photoacoustique. Poulet et al. (1983) ont mis au point une méthode originale qui permet de séparer la composante thermique de la composante oxygène du signal photoacoustique (qui n'ont pas la même phase). L'éclairement de la feuille par une seconde lumière, non modulée et de très forte intensité (saturante pour la photosynthèse), en plus de la lumière modulée réduit le rendement quantique de la production d'oxygène à zéro et supprime ainsi la composante de production d'oxygène modulée du signal photoacoustique (Fig. 12A). Le signal résultant est donc purement photothermique. On effectue alors une rotation des axes de référence (en changeant la phase dans l'amplificateur à mesure de phase) de manière à ce que le signal photothermique apparaisse uniquement dans la



<u>Fig.12</u>. Méthode vectorielle de séparation de la composante photothermique et de la composante "production d'oxygène modulée" du signal photoacoustique produit par une feuille éclairée par une lumière modulée à basse fréquence ( $\leq 100$  Hz) combinée (A) ou non (B) avec une lumière continue saturante. Q, quadrature; I, en-phase. composante en-phase, la quadrature étant nulle. La suppression de la lumière saturante (Fig. 12B) fait réapparaître la production d'oxygène modulée qui apparaît dans les deux composantes. En quadrature, le signal est un signal oxygène pur  $(O_q)$  alors que l'autre composante est un mélange signal photothermique (T) + signal oxygène  $(O_i = S-T)$ . L'amplitude totale du vecteur oxygène  $(A_{OX})$  peut être calculée par la formule:

 $A_{OX} = \sqrt{O_q^2 + O_i^2}$ 

Toutefois, il faut tenir compte des "pertes photochimiques": le signal photothermique obtenu en présence de la lumière saturante (T) est en réalité le signal photothermique maximum obtenu quand l'efficience photochimique est nulle. Les pertes photochimiques peuvent être évaluées en mesurant le signal photothermique à haute fréquence (Bults et al., 1982). En effet, aux fréquences de modulation supérieures à environ 300-400 Hz (suivant les espèces végétales), la production d'oxygène photosynthétique modulée disparaît (la fréquence est trop élévée pour avoir une production d'oxygène modulée) et le signal photoacoustique est purement thermique. Un exemple de signal photoacoustique produit par une feuille illuminée par une lumière modulée à 440 Hz est montré à la figure 13. La comparaison des signaux photothermiques obtenus en présence et absence de la lumière non modulée saturante permet en d'estimer la fraction d'énergie lumineuse (modulée) absorbée qui a été stockée sous forme d'énergie chimique (la même démarche a été adoptée dans l'utilisation du signal de radiométrie photothermique, voir p.17). Connaissant la valeur des pertes photochimiques (PL, "photochemical losses"), Oi peut être calculé rigoureusement de la manière suivante:

$$O_i = S - T(1-PL)$$

Etant donné que l'amplitude du signal photothermique ( $A_{PT} = T$ ) est directement proportionnelle à l'énergie lumineuse absorbée par la feuille, le rapport  $A_{OX}/A_{PT}$  est une mesure relative du rendement quantique de la production d'oxygène photosynthétique in vivo (Poulet et al., 1983).



<u>Fig.13</u>. Signal photoacoustique produit par une feuille éclairée avec une lumière modulée à haute fréquence (440 Hz). S.L., lumière continue saturante; P.L., stockage d'énergie photochimique. Seule la composante en-phase est montrée, la quadrature étant nulle.



Fig.14. Changements transitoires de l'amplitude du signal photoacoustique produit par une feuille de tabac adaptée à l'obscurité et brusquement éclairée par une lumière rouge (650 nm) modulée à 8 Hz.  $\hat{f}$ , lumière saturante allumée; Q, quadrature; I, en-phase.

En résumé, la photoacoustique permet de mesurer très rapidement (1-2 s) le rendement quantique de la production d'oxygène dans une feuille intacte ainsi que le stockage d'énergie photochimique. Auparavant, la mesure du rendement quantique par la méthode polarographique classique (électrode de Clark, voir Delieu & Walker (1983)) était difficile et longue. En outre, le temps de réponse de la technique photoacoustique est très court (ca. 300 ms) et permet ainsi d'étudier des cinétiques rapides de production d'oxygène. Ce qui était pratiquement impossible par les methodes photosynthétiques habituelles (par exemple, pendant une transition obscurité/lumière (voir Fig.14) parallèlement à l'effet Kautsky (Malkin, 1987; Havaux & Malkin, en préparation). La technique photoacoustique a encore d'autres avantages: possibilité d'études spectroscopiques rapides, mesure des signaux provenant de différentes profondeurs de l'échantillon (Buschmann & Prehn, 1983; Buschmann et al., 1984), mesure de courbes de saturation de la production d'oxygène photosynthétique (Poulet et al., 1983; Canaani et al., 1985a), de l'effet Emerson (Canaani & Malkin, 1984),... De plus, le signal est indépendant des propriétés de dispersion de la lumière des échantillons (qui peuvent influencer considérablement les mesures de la fluorescence de la chlorophylle in vivo) et de l'ouverture/fermeture des stomates\* (parce que le signal est produit à l'intérieur de la feuille). Toutefois, l'inconvénient majeur de la technique photoacoustique est que non seulement les mesures sont toujours relatives mais l'échantillon est emprisonné dans une petite cellule hermétiquement fermée et en conséquence, les mesures sont faites dans des conditions très particulières, probablement au point de compensation en CO2.

\*Nous avons observé que la fermeture des stomates par pulvérisation d'acide abscissique (ABA) sur les feuilles ne modifie en rien le signal photoacoustique.

#### D. DIAGNOSTIC RAPIDE DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES PLANTES

semble établi aujourd'hui I1 que les membranes cellulaires, et les membranes chloroplastiques en particulier, constituent le site d'action primaire (ou tout du moins, un de ces sites) de la plupart des contraintes défavorables (stress) de l'environnement (Lyons et al., 1979; Levitt, 1980). Le fait que des stress physico-chimiques aussi différents en apparence que la sécheresse, la salinité ou les basses températures possèdent des sites d'action identiques et résultent en un certain nombre de réactions communes n'est peut-être pas si surprenant si on considère qu'au niveau cellulaire, ces contraintes sont en réalité très semblables. D'ailleurs, certains auteurs n'hésitent pas à regrouper ces divers facteurs du milieu sous le terme générique de "salinité physiologique" (Hamza, 1980; Hubac & Vieira Da Silva, 1980). Aussi bien le gel que la sécheresse ou la salinité mettent en effet en cause une modification de la balance hydrique (diminution du potentiel hydrique foliaire), résultant en une déshydratation des cellules. Ce phénomène a pour conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire en sels et autres composés solubles (acides aminés libres, acides organiques,...) qui peuvent alors atteindre un niveau de concentration toxique et ainsi causer une altération des membranes cellulaires (se reflètant principalement en une perte des propriétés de semi-perméabilité\*). Bref, au niveau cellulaire, les effets des divers stress "déshydratants" se résument d'une certaine manière en un effet de la salinité. Cette action initiale sur les membranes cellulaires peut entrainer par la suite toute une série d'effets secondaires et éventuellement la mort de la plante. Même si cette hypothèse de la "salinité physiologique" semble quelque peu simpliste et si les conditions de stress agissent vraisemblablement sur plusieurs fonctions physiologiques simultanément (Levitt, 1980), elle a cependant le mérite de mettre en evidence la très grande sensibilité des membranes cellulaires vis-à-vis

<sup>\*</sup>Pour les mécanismes d'action possibles des composés toxiques sur les membranes cellulaires, voir Havaux (1980 et 1984).

des contraintes du milieu. De même, il a été suggéré que d'autres facteurs de l'environnement tels la chaleur ou les températures fraîches (dans le cas des espèces d'origine tropicale ou subtropicale) provoquent également une altération des membranes cellulaires: <u>hyperfluidité</u> membranaire dans le premier cas (Levitt, 1980) et <u>solidification</u> de certaines portions de la matrice lipidique des membranes dans le second (Lyons et al., 1979; Murata & Yamaya, 1984).

Comme nous l'avons vu précédemment, les feuilles végétales émettent toute une série de signaux lumineux (fluorescence, luminescence), thermiques et acoustiques dépendant directement de l'activité des membranes thylacoïdiennes et pouvant être mesurés rapidement in vivo par différentes techniques biophysiques. Toute altération du fonctionnement normal de ces membranes, suite à l'action de contraintes du milieu par exemple, doit nécessairement se traduire par une modification de l'émission de ces signaux. En fait, les molécules de chlorophylle peuvent être considérées en quelque sorte comme des marqueurs internes du fonctionnement des membranes chloroplastiques.

Dans notre thèse de doctorat (Havaux, 1984), nous avions déjà émis l'idée qu'il pourrait être possible d'exploiter en pratique cette particularité intéressante des molécules de chlorophylle pour détecter rapidement, in vivo et de manière non destructive des conditions de stress dans les plantes cultivées et donc d'estimer facilement leur état de santé. Ainsi, les effets d'un arrêt et du rétablissement de l'arrosage de plantules de maïs ont pu être suivis in situ par une mesure simple de fluorescence chlorophyllienne (rapport P/O) (Havaux & Lannoye, 1983b). De même, l'importance des dégâts causés par le froid chez le maïs (espèce très sensible aux basses températures) a pu être estimée par la mesure de certains paramètres de fluorescence in vivo (Havaux & Lannoye, 1984 et 1985a). D'autres chercheurs se sont également intéressés à l'application des mesures de fluorescence chlorophyllienne à la détection précoce des dégâts physiologiques induits par les contraintes de l'environnement et une synthèse des recherches réalisées dans ce domaine a été faite par Havaux & Lannoye (1985b) et Renger & Schreiber (1986).

25

D'un autre coté, la quantification, au moyen de diverses méthodes biophysiques, de la réponse aux contraintes du milieu de différentes espèces ou de différentes variétés d'une même espèce pourrait permettre de les comparer et de déterminer ainsi facilement leur résistance relative aux stress. En principe, on pourrait envisager le développement de tests rapides, basés sur des mesures photoacoustiques ou de fluorescence, pour le criblage de génotypes de plantes cultivées résistants aux stress de l'environnement. Cette idée très séduisante a été formulée pour la première fois (en ce qui concerne les mesures de fluorescence) par Smillie et collaborateurs (voir entre autres Smillie & Hetherington (1983) et Hetherington et al. (1983)). Enfin, combinées à d'autres techniques in vivo (polarographie, spectroscopie d'absorbance), les mesures des signaux thermiques, acoustiques et de fluorescence constituent un outil très performant qui pourrait permettre de comprendre les mécanismes de modulation l'activité photosynthétique et de contrôle de par l'environnement. Ce sont ces différents problèmes (détection de stress/ méthodes rapides de criblage/ modulation de l'activité photosynthétique) que j'ai principalement étudiés au cours de ces dernières années dans de nombreuses espèces végétales (tabac, blé dur, haricot, peuplier,...) soumises à différents types de contraintes (déficit hydrique, basses/hautes températures, lumière). Les contraintes étudiées peuvent être considérées comme les plus importants facteurs de l'environnement qui limitent la distribution géographique et la productivité des plantes sur la terre (à ce propos, voir notamment Witt & Barfield, 1982; McWilliam, 1986). Une sélection des principaux résultats obtenus est présentée dans le chapitre suivant. Le but de cette thèse est d'indiquer des approches expérimentales appropriées et de montrer quels genres de renseignements à caractère pratique peuvent être obtenus.

Depuis longtemps, la sécheresse a été reconnue comme un des plus importants facteurs écologiques qui affectent la photosynthèse (pour une synthèse, voir Boyer, 1976; Kriedemann & Downton, 1981). Un déficit hydrique dans les feuilles végétales se traduit par une réduction du taux d'assimilation photosynthétique du CO2 qui a été attribuée d'une part à une fermeture des stomates (Moldau, 1973; O'Toole et al., 1977) et à une augmentation de la résistance à la diffusion du CO2 dans les cellules du mésophylle (Mederski et al., 1975) et d'autre part à une composante non stomatique (Boyer, 1971; Boyer, 1976; Cornic et al., 1983). Un certain nombre de travaux ont suggéré que la sécheresse affecte directement les processus photochimiques primaires de la photosynthèse et, en particulier, ceux liés au PS II (Fry, 1970; Mohanty & Boyer, 1976; Govindjee et al., 1981; Newton et al., 1981; Havaux & Lannoye, 1983b). Cependant, d'autres chercheurs sont arrivés à une conclusion fort différente et pratiquement opposée, en montrant que le transport photosynthétique d'électrons et la photochimie primaire sont particulièrement résistants aux contraintes hydriques (Sharkey & Badger, 1982; Schreiber & Bilger, 1985; Genty et al., 1987; Ben et al., 1987). Ces contradictions, qui peuvent s'expliquer en partie par l'utilisation de différentes méthodes de mesure (in vivo, in vitro), de différentes espèces végétales et de différents types de stress (rapides, lents), montrent que les mécanismes par lesquels la sécheresse affecte la photosynthèse sont encore loin d'être compris clairement. De par ses caractéristiques (insensibilité vis-à-vis de la fermeture des stomates, mesure de l'activité photosynthétique brute,...), la méthode photoacoustique, associée aux mesures de fluorescence chlorophyllienne in vivo et d'absorbance foliaire, constituent un outil idéal pour examiner in situ les effets des contraintes hydriques sur la photosynthèse.

## A. Déshydratation foliaire rapide suivie par photoacoustique: méthodologie.

Une dessiccation foliaire rapide fournit un exemple très

parlant du danger qui peut exister lorsqu'on utilise les signaux photoacoustiques in vivo tels quels sans précaution.

Des petits disques de feuilles de tabac (Nicotiana tabacum L., var. Xanthi) ont été rapidement déshydratés à l'air libre et à l'obscurité (pour plus de détails, voir Havaux & Lannoye, 1985c et Havaux et al., 1986a). Après 4 h de déshydratation, le contenu relatif en eau des échantillons foliaires a été réduit à environ 30%, ce qui correspond à un potentiel hydrique foliaire de -23 bars (au lieu de -8 bars dans les témoins).

Cette dessiccation rapide des feuilles a causé une modification considérable du signal photoacoustique mesuré à basse fréquence (Fig. 15): l'amplitude de la composante oxygène du signal a diminué alors que l'amplitude du signal photothermique a fortement augmenté. Comme le montre la figure 16, le spectre de réflection de la lumière par les feuilles de tabac n'a été que très peu affecté par la dessiccation, indiquant que les propriétés optiques des feuilles sont restées pratiquement inchangées. L'augmentation de ApT ne peut donc s'expliquer par une augmentation de l'absorption lumineuse par les feuilles et une autre explication doit être trouvée.

Dans des conditions où la distance spécifique de diffusion thermique (c'est-à-dire, la distance caractéristique qui, lorsqu'elle est parcourue par une onde thermique, résulte en une atténuation de cette onde par un facteur l/e (= 0.37 environ)) est nettement supérieure à la distance spécifique ou l'absorption lumineuse, les ondes thermiques réelle de produites sur la distance où la lumière est absorbée arrivent non atténuées à la surface et sont donc proportionnelles à l'absorption totale de la lumière. L'amplitude de la modulation thermique est ainsi proportionnelle à l'énergie lumineuse (intégrée) incidente pendant un cycle (donc proportionnelle à la durée du cycle et par conséquent, inversément proportionnelle à la fréquence). Dans les feuilles non stressées, ApT a été en effet linéairement relié à l/f sur une très large gamme de fréquences (5-1000 Hz), mis à part toutefois une petite déviation aux basses fréquences (Fig. 17). Dans les feuilles déshydratées, on peut également observer une gamme de basses fréquences où ApT est



<u>Fig.15</u>. Signal photoacoustique (composante en-phase) émis par une feuille de tabac (A, témoin; B, déshydratée pendant 4 h) éclairée par une lumière rouge (680 nm, 6.5 W m<sup>-2</sup>) modulée à une fréquence de 24 Hz. S.L., lumière saturante (460 W  $m^{-2}$ ).



<u>Fig.16</u>. Spectre de réflection de la lumière visible d'une feuille de tabac (-----, témoin; ----, déshydratée pendant 4 h). Les spectres ont été mesurés au moyen d'un spectromètre CARY 16 équippé d'une sphère d'intégration.

proportionnel à l/f avec une pente plus grande que dans les témoins. Cependant, lorsque la fréquence de modulation augmente, on observe une très forte déviation vers de plus faibles valeurs qui finallement tendent vers une nouvelle proportionalité avec l/f dont la pente est plus faible. Il apparaît que le signal photothermique des feuilles stressées formé de deux composantes: une qui disparaît aux est fréquences élevées et une autre qui persiste à toutes les fréquences. Le graphique inséré dans la figure 17 montre qu'en réalité le signal photothermique à très hautefréquence est identique dans les témoins et les feuilles déshydratées. C'est donc la composante éliminée aux hautes fréquences et visible uniquement aux basses fréquences qui a été affectée par la contrainte hydrique. Ces résultats semblent confirmer l'idée de Larue et al. (1985) suivant laquelle il y aurait deux types de signaux photothermiques provenant d'ondes thermiques "internes" T<sub>i</sub> (le signal acoustique est produit dans les espaces intercellulaires; Ti suivrait la même voie (très courte, environ 1 µm) de diffusion que l'oxygène) et d'ondes thermiques Ts qui rejoignent la surface (atténuées plus vite que Ti lorsque la fréquence augmente étant donné une voie de diffusion beaucoup plus longue (environ 30 µm)). Des observations microscopiques (non présentées ici) nous ont montré une considérable réduction des espaces extracellulaires et un rétrécissement des cellules du mesophylle, résultant en une meilleur surface de contact entre les cellules et probablement en une plus grande probabilité pour les ondes T<sub>s</sub> d'atteindre la surface thermiques (d'où vraisemblablement, l'augmentation de T<sub>s</sub>). Il faut remarquer que T<sub>s</sub> existe aussi dans les témoins mais est à peine visible.

Un examen plus quantitatif des données (voir Havaux et al., 1986a) montre cependant que cette théorie est trop simplifiée. De toute évidence, le signal photoacoustique produit par une feuille est un phénomène très complexe. Visiblement, les modèles existants (par exemple, celui de Rosencwaig & Gersho, cf. Rosencwaig (1980)) ne peuvent être appliqués tels quels aux végétaux. Ce qui a malheureusement été fait dans certains cas.

L'observation la plus importante est qu'à haute fréquence,
En utilisant donc le rapport de  $A_{OX}$  sur  $A_{PT}$  des témoins, les résultats présentés à la figure 15 montrent directement que le rendement quantique de la production d'oxygène a très fortement diminué après le stress hydrique rapide. Toutefois, il faut considérer le fait que les changements morphologiques causés par le stress ont pu modifier la voie de diffusion de l'oxygène et en conséquence le signal photoacoustique d'oxygène. Ce problème peut être examiné en utilisant l'approche de Poulet et al. (1983): le graphique du logarithme du rapport  $A_{OX}/A_{PT}$  en fonction de la racine carrée de la fréquence est linéaire (pour des fréquences inférieures à environ 100 Hz) avec une pente égale à

 $-\sqrt{\pi}$  1 (  $1/\sqrt{D_{ox}} - 1/\sqrt{D_{th}}$ )

où l est la longueur moyenne de la voie de diffusion de la chaleur et de l'oxygène des chloroplastes jusqu'à la paroi des cellules, et  $D_{OX}$  et  $D_{th}$  sont respectivement le coefficient de diffusion de  $O_2$  et la diffusivité thermique dans le milieu aqueux de la cellule (en réalité,  $1/\sqrt{D_{th}}$  est très petit et peut être négligé). La figure l8 montre que la pente de la droite a été très nettement modifiée (surtout au début du stress, pendant les deux premières heures) - un effet qui reflète vraisemblablement les changements anatomiques de la feuille affectant différemment l (par rétrécissement des cellules) et les coefficients de diffusion (par changement de viscosité de l'intérieur des cellules).

Ce changement de pente indique que des facteurs autres que l'inhibition de l'activité photosynthétique sont impliqués dans la modification des signaux photoacoustiques. Ces



<u>Fig.17</u>. Amplitude du signal photothermique  $A_{PT}$  en fonction de l'inverse de la fréquence de modulation dans une feuille de tabac témoin ( $\Delta$ ) et dans des feuilles déshydratées pendant 2 (•) ou 4 h (o). Le graphique inséré dans la figure montre  $A_{PT}$  des différents types de feuilles dans la zone des hautes fréquences.



<u>Fig.18</u>. Logarithme du rapport  $A_{OX}/A_{PT}$  en fonction de la racine carrée de la fréquence de modulation dans des disques de feuilles de tabac déshydratés pendant 0 ( $\Delta$ ), 2 (•), 4 (o) et 5.5 h ( $\Box$ ).

facteurs peuvent être éliminés en utilisant, comme mesure du production d'oxygène rendement quantique de la photosynthétique, l'intersection de la droite avec l'axe des y (c'est-à-dire, AOX/ApT à la fréquence 0). Dans ce cas, l'inhibition de l'activité photosynthétique a été de 40% après 4 h de stress hydrique (au lieu de 80% (!) si on utilise une mesure à la fréquence de 24 Hz). Un rétablissement complet et rapide aussi bien de l'activité photosynthétique que des paramètres de diffusion a été observé au cours de la réhydratation des tissus stressés (et ce même pour des disques de 80% de leur activité foliaires ayant perdu près photosynthétique!) (Fig. 19). Cette réversibilité rapide suggère que l'inhibition de la photosynthèse causée par un stress hydrique rapide est due à des changements de conformation des membranes thylacoïdiennes.

La figure 20 montre l'évolution du stockage d'énergie photochimique (mesuré à 440 Hz) au cours de la dessiccation rapide et de la réhydratation des feuilles de tabac. Le stockage d'énergie photochimique a été visiblement beaucoup plus affecté que la production d'oxygène. A la fréquence utilisée, le stockage d'énergie mesuré correspond à un interval de temps d'environ 0.4 ms après la capture de l'énergie lumineuse (Malkin & Cahen, 1979). Cet ordre de temps pourrait suggéré que l'activité de phosphorylation a été rapidement perdue au cours du stress hydrique. La grande sensibilité de cette réaction vis-à-vis des conditions de sécheresse a été montrée également par d'autres à l'aide d'autres techniques in vitro et in vivo (Younis et al., 1979; Ortiz-Lopez et al., 1987).

# B. Mesures in situ du mécanisme d'action du stress hydrique rapide sur l'appareil photochimique des chloroplastes.

Le chapitre précédent montre qu'une déshydratation rapide des feuilles de tabac agit directement sur le transfert photosynthétique d'électrons. Des recherches portant sur des algues, des chloroplastes isolés et des feuilles ont mis en évidence que certaines réactions partielles du transport d'électrons sont plus sensibles que d'autres aux conditions de sécheresse (Mohanty & Boyer, 1976; Wiltens et al., 1978; Govindjee et al., 1981; Matorin et al., 1982; Havaux &



Fig.19. Effet de la réhydratation sur la dépendance vis-à-vis de la fréquence du rapport  $A_{OX}/A_{PT}$  dans des disques de feuilles de tabac. Les disques déshydratés pendant 2 ( $\blacksquare$ ) ou 4.5 h (•) ont été réhydratés pendant 2 h (respectivement,  $\square$  et o). Disques témoins,  $\blacktriangle$ .



<u>Fig.20</u>. Stockage d'énergie photochimique dans des disques de feuilles de tabac soumis à une déshydratation à l'air libre. Au temps indiqué par la flèche, les disques stressés ont été transférés dans l'eau.

Lannoye, 1983b). Une image plus ou moins claire du mécanisme d'action d'un stress hydrique rapide peut être obtenue en utilisant une combinaison de diverses techniques in vivo: fluorescence chlorophyllienne (fournissant des informations sur le PS II), spectroscopie différentielle d'absorption du cytochrome f (cyt f) (fournissant des informations sur le PS I) et la photoacoustique (fournissant des informations sur le rapport des activités PS II/PS I, par l'intermédiaire de la mesure de l'effet Emerson (Canaani & Malkin, 1984)).

Activité du PS I. Lorsqu'une feuille est éclairée par une lumière rouge-lointain (>700 nm), l'absorption de la feuille à 554 nm change (Bishop et al., 1972; Havaux et al., 1986b). Cette modification d'absorption, qui reflète l'oxydation du cyt f par le PS I, peut être facilement mesurée in vivo à l'aide d'un spectrophotomètre très sensible (du type Aminco DW-2, par exemple) opérant dans le mode différentiel (l'absorption à 554 nm est comparée à celle à 540 nm). Les courbes de l'oxydation du cyt f en fonction de l'intensité de la lumière rouge-lointain (Fig. 21) peuvent être utilisée comme indicateur de l'activité du PS I\*. La figure 21 montre que cette courbe de saturation est restée largement inchangée après la dessiccation rapide (pente de la partie linéaire non modifiée de saturation légèrement augmenté), et niveau indiquant une grande résistance du PS I vis-à-vis du stress.

Activité du PS II. Les courbes d'induction de la fluorescence de la chlorophylle a peuvent être utilisées comme indicateur du flux d'électrons au niveau du PS II. Le stress hydrique rapide a résulté en une diminution importante de l'amplitude de la fluorescence variable (Fig. 22), indiquant une inhibition de l'activité du PS II. Le degré d'inhibition de la fluorescence chlorophyllienne induite s'est révélé être identique à celui du transfert linéaire d'électrons (mesuré photoacoustiquement par le rendement quantique de la produc-

\*Il existe d'autres méthodes, basées sur des changements d'absorbance foliaire, permettant d'estimer l'activité du PS I in vivo. Ainsi, par exemple, l'oxydation et la réduction du P700 se traduisent par des changements mesurables d'absorbance à 820 nm (Harbinson & Woodward, 1987).



<u>Fig.21</u>. Amplitude des changements d'absorbance foliaire à 554 nm (référence à 540 nm) induits par différentes intensités de lumière rouge-lointain (> 715 nm) pour des feuilles de tabac témoins (•) et déshydratées pendant 4 h (o).



Fig.22. Courbes d'induction de la fluorescence chlorophyllienne (changements rapides) émise par des feuilles de tabac.

Expérience I:

a) feuille témoin,

b) feuille déshydratée pendant 4 h,

c) feuille incubée pendant l h dans une solution d'hydroxylamine l0 μM puis déshydratée pendant 4 h,

Expérience II:

d) feuille témoin,

e) feuille déshydratée pendant 4 h,

f) feuille incubée dans methylamine 5 mM puis déshydratée,

 h) feuille incubée dans hydrazine 10 mM puis déshydratée. tion d'oxygène (pas montré ici)), suggérant que le site d'action du stress hydrique rapide se situe au niveau du PS II. Toutefois la réduction de la fluorescence n'a pas été observée quand les échantillons foliaires ont été infiltrés avec un donneur d'électrons du PS II (hydroxylamine, methylamine, hydrazine) avant le traitement stressant. Cette observation indique que c'est le côté donneur d'électrons du PS II (probablement le système enzymatique d'oxydation de l'eau) qui a été altéré par la déshydratation foliaire rapide.

Balance des activités PS I/PS II. Une caractéristique importante de la technique photoacoustique est la possibilité d'estimer les activités relatives des deux photosystèmes, indiquées par l'effet Emerson (augmentation de la production d'oxygène suite à l'addition d'une lumière rouge-lointain absorbée préférentiellement par le PS I). La figure 23 montre une expérience de photoacoustique "en continu" pendant laquelle l'effet Emerson a été mesuré, dans des feuilles de tabac témoins et déshydratées pendant 4 h, au cours de transitions réversibles entre l'état l et l'état 2.



Fig.23. Transitions état l-état 2 suivies par photoacoustique dans des disques de feuilles de tabac témoins (A) et déshydratés pendant 4 h (B). Les changements d'état ont été quantifiés en allumant la lumière rouge-lointain (710 nm) à l'état 2 et en la coupant à l'état l (permettant de mesurer le renforcement d'Emerson). S.L., lumière saturante. L'éclairement prolongé de la feuille par une lumière modulée rouge (initiallement absorbée principalement par le PS II) résulte en une transition vers l'état 2 où l'énergie lumineuse est distribuée équitablement entre absorbée les deux L'addition d'une lumière rouge-lointain photosystèmes. continue (absorbée surtout par le PS I) induit une très faible augmentation de la production d'oxygène (faible renforcement d'Emerson) étant donné que, dans cet état, le PS I est peu limitant. Par contre, l'adaptation de la feuille à cette lumière rouge-lointain se traduit alors en une transition vers l'état l caractérisé par un très fort déséquilibre de la distribution d'énergie d'excitation au profit du PS II. La suppression de la lumière continue rouge-lointain résulte en une très forte diminution du signal photoacoustique d'oxygène (grand renforcement d'Emerson). Aussi bien les feuilles deshydratées que les feuilles non stressées ont présenté ces transitions d'état induites par la lumière.

L'effet Emerson (rapport de la production d'O<sub>2</sub> en présence de la lumière rouge lointain sur la production d'O<sub>2</sub> en son absence) est un indicateur de la valeur du rapport  $\beta/\alpha$ où  $\beta$  et  $\alpha$  sont respectivement les potentiels photochimiques maxima (rendement quantique x distribution lumineuse) du PS II et du PS I (Canaani & Malkin, 1984). Le calcul du renforcement d'Emerson aux états l et 2 dans les feuilles déshydratées ou non a donné des résultats très surprenants:

	Etat 1	Etat 2
Témoins	1.253	1.074
Déshydratés	1.363	1.225

La déshydratation foliaire n'a pas réduit la valeur de ce renforcement: au contraire, l'effet Emerson a même augmenté très fortement à l'état 2. Nous sommes donc face à une situation paradoxale où  $\beta/\alpha$  a augmenté alors que  $\beta$  a diminué et  $\alpha$  est resté largement inchangé (?). La préservation de  $\alpha$ , indiquée par les mesures de photooxydation du cyt f, est confirmée par la figure 24 qui montre la valeur de l'effet Emerson (à l'état l) en fonction du rapport de la lumière rouge-lointain (lumière l) sur la lumière modulée rouge (lumière 2). La partie linéaire de la courbe fournit une



<u>Fig.24</u>. Renforcement d'Emerson à l'état l en fonction du rapport de l'intensité de la lumière l (701 nm) sur l'intensité de la lumière 2 (lumière modulée-650 nm) dans des disques de feuilles de tabac témoins (•) ou déshydratés pendant 4 h (o).



<u>Fig.25</u>. Modèles du transfert d'électrons entre le PS II et le PS I (à gauche) et la relation entre le renforcement d'Emerson et le % d'inhibition du PS II prédit par chaque modèle (à droite).

 A) Transfert "au hasard" des électrons entre les deux photosystèmes;
 B) photosystèmes liés. mesure relative de rendement quantique du PS I pour l'effet de renforcement: la pente de la droite est restée inchangée. La conservation du rapport  $\beta/\alpha$  est un résultat extrêmement surprenant et impossible à expliquer, en tout cas avec le modèle actuellement accepté de la diffusion "au hasard" des électrons entre des photosystèmes séparés et localisés en des zones membranaires différentes (Anderson, 1975; Arntzen, 1978; Anderson, 1981). Cet effet, qui a été observé dans d'autres cas où le PS II est inhibé préférentiellement (froid, chaleur, DCMU) (Malkin et al., 1986b; Yakir et al., 1986), peut être expliqué si on suppose que chaque centre du PS II est associé à un centre du PS I correspondant. Nous avons discuté en détail ce concept des photosystèmes liés dans un article (Malkin et al., 1986b). Suivant ce modèle (voir Fig. 25), la destruction de certaines unités PS II (B diminué) doit résulter en une inhibition du transfert d'électrons de toute la chaîne (diminution du rendement quantique apparent) alors que les chaînes restées intactes se comportent normalement en ce qui concerne l'effet Emerson ( B/ a intact).

### C. Stress hydrique lent induit par arrêt de l'irrigation des plantes.

La dessiccation rapide d'échantillons foliaires représente une situation très différente de celle qui se passe dans des conditions naturelles où le stress est beaucoup plus lent et des phénomènes d'adaptation (ajustement osmotique) peuvent se développer. Nous avons donc examiner si la méthodologie développée pour la déshydratation foliaire "artificielle" peut s'appliquer également au stress hydrique lent (se développant sur une quinzaine de jours) provoqué par arrêt d'arrosage de plantes (tabac) cultivées en conditions naturelles. Les résultats ont été présentés et discutés en détails dans un article (Havaux et al., 1987a). Les conclusions principales ont été les suivantes:

\* de même que pour la déshydratation foliaire rapide, le stress hydrique lent a modifié le signal photoacoustique par un effet sur les propriétés de diffusion de la feuille (changement de la pente du graphique ln ( $A_{OX}/A_{PT}$ ) en fonction de  $\sqrt{f}$  (Fig. 26A)) et sur l'activité photosynthétique (extrapolation de  $A_{OX}/A_{PT}$  à la fréquence 0 (Fig. 26B)). Il



<u>Fig.26</u>. A) Pente (valeur absolue) de la droite représentant la relation existante entre ln  $(A_{OX}/A_{PT})$  et  $\sqrt{f}$ , et B) rendement quantique de la production d'oxygène (extrapolation de  $A_{OX}/A_{PT}$  à la fréquence O) dans des feuilles de tabac ayant différents contenus relatifs en eau.

est donc impératif d'étudier la dépendance du signal vis-à-vis de la fréquence de modulation (comme expliqué en IIA) afin de séparer ces effets multiples.

\* la figure 26B montre que l'inactivation du transfert d'électrons s'est faite en deux phases: inhibition très faible suivie d'une brusque chute de l'activité (à partir d'un contenu relatif en eau de 60%). Des mesures complémentaires de l'activité du PS II (fluorescence chlorophyllienne à température ambiante et à 77K), du PS I (photooxydation du cyt et de la distribution de l'énergie entre les deux f) photosystèmes (Effet Emerson) ont révélé une phénoménologie beaucoup plus complexe que dans le cas du stress rapide (Havaux et al., 1987a). Bien qu'il aie été confirmé que le PS II est plus sensible à la sécheresse que le PS I, les dégâts ont été localisés dans le centre réactionnel primaires et/ou au niveau de sa connection avec les lui-même pigments-antennes (et non plus au niveau du côté donneur du PS II). Ces altérations ont causé des d'électrons changements très complexes dans la distribution de l'énergie d'excitation.

\* les effets de la sécheresse en conditions naturelles sont réversibles (mais beaucoup plus lentement que dans le cas de la déshydratation rapide) et apparemment indépendants d'effets photoinhibiteurs. Le tabac apparaît donc comme une espèce, telle le cotonnier (Genty et al., 1987) ou le saule (Ögren et Öquist, 1985), qui n'est pas sensibilisée à la photoinhibition dans des conditions de déficit hydrique, au contraire d'autres espèces telles Nerium oleander par exemple (Björkman & Powles, 1984).

## D. Tests rapides de sélection de plantes résistantes à la sécheresse

La déshydratation rapide de disques de feuilles de tabac résulte en une forte diminution de l'amplitude de la fluorescence variable. Cet effet diffère cependant suivant les espèces végétales: l'inhibition de la fluorescence variable peut être faible (le haricot, Havaux & Lannoye, 1985d) ou même pratiquement inexistante (le blé dur, Havaux & Lannoye, 1985c). En général, la décroissance lente de la fluorescence chlorophyllienne après le pic P est un phénomène beaucoup plus



Fig.27. Courbes d'induction de la fluorescence de la chlorophylle émise par des morceaux de feuilles blé dur (var. Tell) de soumis à une déshydratarapide à tion l'air pendant 0, 4, 6 et 8 h. La flèche indique le moment où les échantillons de feuilles. préalablement adaptés à l'obscurité pendant 30 min, ont été brusquement illuminés.

sensible aux conditions de sécheresse dans la plante (Lichtenthaler et al., 1986). La figure 27 montre une courbe d'induction de la fluorescence de la chlorophylle émise par une feuille de blé dur (var. Tell) soumise à une dessiccation rapide. L'inhibition de l'extinction de la fluorescence (de P à S) apparaît comme le changement le plus marqué. Ce phénomène peut être quantifié en calculant le rapport (P-S)/S (Fig. 28). Comme le montre la figure 29, ce rapport est linéairement relié au potentiel hydrique foliaire  $\Psi$  (tout au moins pour les potentiels hydriques supérieurs à -30 bars). Il est intéressant de remarquer que la pente de la droite de la variété de blé dur Tell (moyennement résistante à la sécheresse) diffère de celle de Dougga B. (variété de blé tendre très résistante à la sécheresse). Pour une même valeur du potentiel hydrique foliaire, l'inhibition de la phase P-S a été beaucoup moins forte dans le génotype très résistant que dans le génotype moins résistant. Le rapport (P-S)/S apparaît donc comme un indicateur intéressant (et facile à mesurer) du degré de résistance à la sécheresse chez le blé.



Fig.28. Amplitude de la fluorescence variable (P-O)/O et rapport (P-S)/S déterminés à partir des courbes d'induction de la fluorescence de la chlorophylle de feuilles de blé dur (var. Tell) exposées à la déshydratation. Barres verticales= déviations standards des moyennes (n=5).



Fig.29. Corrélation entre la décroissance de la fluorescence de la chlorophylle de P à S (quantifiée par le rapport (P-S)/S) et le potentiel hydrique des feuilles d'une variété de blé tendre très résistante à la sécheresse (Dougga B.) et d'une variété de blé dur moyennement résistante (Tell). Cette idée a été testée et confirmée en soumettant à une déshydratation rapide (4 h) les feuilles de 24 variétés de blé dur possédant différents degrés connus<sup>\*</sup> de résistance à la sécheresse (Tableau l). Le rapport (P-S)/S permet de distinguer aisément trois classes de plantes (très résistantes, moyennement résistantes, sensibles) et peut donc servir de base pour établir un test rapide de sélection de génotypes de blé adaptés à la sécheresse.

Malheureusement, la nécessité d'adapter les feuilles à l'obscurité pendant un laps de temps relativement long réduit la possibilité de cribler un très grand nombre d'échantillons et empêche les mesures en plein champ. Ce problème peut être résolu en utilisant une technique de fluorescence modulée qui permet d'estimer la composante photochimique (q<sub>0</sub>) de l'extinction de la fluorescence à l'état stationnaire (c'est-à-dire, dans une feuille photosynthétisant à une certaine intensité lumineuse) en utilisant des éclairs de lumière saturante (pour le principe de cette technique, voir Introduction p.10). Le tableau 2 montre qu'il est possible de classer les variétés (connues) et les génotypes (inconnus) en fonction de leur resistance relative à la sécheresse sur base de l'inhibition de qo après un stress rapide. Les différences entre cultivars sont cependant moins fortes qu'en utilisant (P-S)/S comme indicateur de résistance. Cela s'explique vraisemblablement par le fait (P-S)/S et qo mesurent deux phénomènes différents (dans le premier cas, il s'agit d'une mesure globale et finalement peu rigoureuse de l'extinction de la fluorescence après P et dans l'autre, une mesure plus correcte d'une composante (q0) de l'extinction). De plus, pour des raisons pratiques (voir Havaux et al., 1987e), les mesures ont été faites dans des conditions

\*La résistance à la sécheresse des variétés de blé dur et tendre utilisées a été déterminée à la Station d'Amélioration des Plantes de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier en utilisant, comme critères, le rendement, la concentration foliaire en proline libre, la résistance foliaire à la transpiration et la turgescence cellulaire (Monneveux & Nemmar, 1986; P. Grignac, Comm. Pers., 1987).

#### TABLEAU 1

Effet de la déshydratation pendant 4 h d'échantillons de feuilles de 24 variétés de blé dur sur l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle (de P à S), mesurée par le rapport (P-S)/S. Le potentiel hydrique des feuilles traitées a été de -17+2 bars pour toutes les variétés à l'exception de FlorencexAurore, Poinville et Tomclair dont le potentiel hydrique a été de -27 bars. Potentiel hydrique des témoins = -4+1 bars.

Variétés	(P-S)/S	
	Témoins	Traités
		. <b>*</b> 5
sócharassa		
Oved Zenati	0 39+0 020	0 38+0 08 (100%)
Polonicum	0 69+0 05	$0.59\pm0.03$ (85%)
Hedha 3	0 54+0 12	$0,45\pm0,05$ (83%)
Ang	0 58+0 04	0 46+0 05 (79%)
Dougga B	0 58+0 07	$0, 44 \pm 0, 12$ ( 26%)
Aziza	0 51+0 02	$0.36\pm0.05$ ( $70\%$ )
Gloire de Mongolfier	0 78+0.06	0,54+0,07 ( 69%)
Tassili	0 58+0 05	$0.37\pm0.06$ ( 64%)
Moyennement résistantes	ñ 7920 08	0 47+0 10 ( 529)
Nahon Damian	0,72+0,00	0 19 0 99 ( 570)
Pakham	0,74+0,11	0 34,0 22 ( 578)
Neknem Maha	0,04+0,05	0 36-0 00 ( 517)
Maakpahi	0,7070,05	0 35+0 06 ( 51%)
This FF	0,53+0,00	0 22+0 10 ( 51%)
Schol	0,61+0,00	0,20+0,10 ( $010$ )
Mondun	0 64+0 05	0 25+0 06 ( 39%)
KKR	0 82+0 13	0 30+0 06 ( 32%)
Te11	0 62+0 03	$0^{23+0}07(373)$
1000	0,0010,00	0,20,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
Sensibles		
Timgad	0,74+0,06	0,21 <u>+</u> 0,05 ( 28%)
Hd 1220 Kalb	0,70+0,07	0,13+0,12 ( 18%)
Poinville	0,69+0,06	0,10 <u>+</u> 0,04 ( 14%)
Tomelair	0,72+0,05	0,09+0,03 ( 12%)
Cando	0,64+0,04	0,07+0,05 ( 11%)
FlorencexAurore	0,66+0,07	0,07+0,07 ( 11%)

<sup>a</sup>Les valeurs données dans le tableau sont les moyennes de 5 mesures <u>+</u> déviation standard. Entre paranthèses: valeurs des traités en % des témoins

expérimentales légèrement différentes:  $q_Q$  a été mesuré avec une densité de flux de photons de la lumière actinique blanche d'environ 1000 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> alors que le rapport (P-S)/S a été déterminé avec une faible lumière rouge (15 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la conservation de l'activité d'extinction de la fluorescence dans des échantillons foliaires rapidement déshydratés est caractéristique de plantes adaptées à la sécheresse et peut servir d'indicateur simple et rapide de la tolérance relative à la sécheresse chez le blé (dur ou tendre) et probablement chez les céréales en général.

TABLEAU 2

Effet de la déshydratation pendant 4 h de feuilles de cultivars de blé dur sur la composante photochimique  $q_Q$  de l'extinction de la fluorescence chlorophyllienne.

Noms des variétés et des génotypes	qQ (%)		
	témoins	traités ·	
<u>Résistants à la</u> <u>sécheresse</u> Waha Bidi 17 Arz Hedba 3 Mohamed Ben Bachir Tassili Khroub 28-4-2	0,90 <sup>a</sup> 0,91 0,89 0,70 <u>+</u> 0,01 0,90 0,90 0,91 0,66 <u>+</u> 0,01	0,86 (96%) 0,872 (96%) 0,84 (94%) 0,65 <u>+</u> 0,15 (93%) 0,83 (92%) 0,81 (90%) 0,81 (89%) 0,52 <u>+</u> 0,06 (79%)	
<u>Sensibles</u> 408-7 36 522-2-7 1710 Clairdoc Tomclair 37 Poinville KKB Durelle 37-7-7 30-1-2	0,69+0,01 0,64+0,03 0,76+0,01 0,75+0,01 0,79+0,03 0,89+0 0,83+0,01 0,89 0,88 0,89 0,77+0,01 0,69+0,10	$\begin{array}{ccccccccc} 0,52\pm 0,08 & (75\%) \\ 0,47\pm 0,04 & (73\%) \\ 0,53\pm 0,02 & (70\%) \\ 0,48\pm 0,04 & (64\%) \\ 0,49\pm 0,10 & (62\%) \\ 0,52\pm 0,01 & (58\%) \\ 0,45\pm 0,04 & (54\%) \\ 0,46 & (52\%) \\ 0,44 & (50\%) \\ 0,39 & (44\%) \\ 0,29\pm 0,01 & (37\%) \\ 0,19\pm 0,07 & (27\%) \end{array}$	

<sup>a</sup>Les valeurs présentées dans ce tableau sont soit les moyennes de trois expériences <u>+</u> déviation standard, soit les résultats d'une expérience. Entre parenthèses: valeurs des feuilles traitées exprimées en % des témoins.

#### III. HAUTES TEMPÉRATURES

L'incubation de feuilles, de chloroplastes isolés et d'algues à des températures supérieures de 20-30°C à leurs températures normales de croissance conduit à une inhibition marquée de leur capacité de fixation de CO2 et de production d'oxygène (Berry & Björkman, 1980). Une des fonctions photosynthétiques les plus sensibles à la chaleur est le système de capture d'énergie lumineuse du PS II. Des mesures par microscopie électronique de cryofractures (Armond et al., 1979; Gounaris et al., 1984) ainsi que des mesures de fluorescence chlorophyllienne (Schreiber & Berry, 1977; Armond et al., 1978; Smillie, 1979) ont montré que la chaleur provoque une dissociation physique entre les centres réactionnels du PS II et leurs pigments-antennes. Au niveau de l'émission de fluorescence chlorophyllienne, cet effet se traduit en une augmentation substantielle du niveau  $O(F_0)$ . De nombreuses études ont démontré que la température à laquelle Fo commence à augmenter est un très bon indicateur du degré de résistance à la chaleur de la plante (Smillie & Nott, 1979; Smillie & Gibbons, 1981; Bilger et al., 1984). Des exemples de courbes montrant la dépendance de Fo vis-à-vis de la température sont donnés à la figure 30 pour une série de clones de peuplier (Populus sp.) possédant différents degrés de résistance aux hautes températures.

La destruction par les températures élevées de l'appareil photochimique a été suivie, par la méthode photoacoustique, dans les feuilles de différents génotypes de haricot possédant différents degrés de tolérance à la chaleur (connus et déterminés par d'autres méthodes (cf. Duke (1978), Marsh & Davis (1985)). La figure 31 montre l'évolution du rapport A<sub>OX</sub>/Ap<sub>T</sub> et du stockage d'énergie photochimique dans des feuilles de deux génotypes de haricot (Phaseolus acutifolius var. latifolius, résistant à la chaleur, et Phaseolus vulgaris cv. Mollekens, sensible à la chaleur) soumis à un traitement à 40.5°C. Dans l'espèce sensible, les deux paramètres photoacoustiques ont drastiquement diminués alors qu'ils ont été peu affectés dans l'espèce résistante. L'utilisation d'une température d'incubation légèrement



<u>Fig.30</u>. Dépendance vis-à-vis de la température du niveau O de la fluorescence ( $F_0$ ) dans les feuilles de 5 clones de peuplier (Ra, Raspalje; Bp, Beaupré; Fp, Fritzi Pauley; Cr, Columbia River; Rob, Robusta).



Effets Fig.31. d'un à la chaleur traitement (40.5°C) sur A) le rendement quantique de la production d'oxygène (A<sub>OX</sub>/A<sub>PT</sub>) et sur B) le stockage d'énergie photochimique dans des disques de feuilles de vulgaris Phaseolus cv. Mollekens (•, sensible à la chaleur) et de P. acutifolius latifolius var. (o, résistant).

supérieure (42°C) permet de séparer les 6 génotypes de haricot examinés en 3 groupes distincts (Fig. 32): 1) les génotypes très résistants à la chaleur (P. acutifolius var. Latifolius et P. vulgaris cv. Alabama), 2) les génotypes moyennement résistants (P. lunatus cv. Forhook bush et P. vulgaris cv. Copper wax) et le groupe des génotypes sensibles (P. vulgaris cv. Mollekens et Hatives du Limbourg, toutes deux variétés commercialisées en Belgique). Ces résultats confirment l'intérêt de mesures photoacoustiques pour des applications pratiques de détermination de résistante relative de plantes aux stress de l'environnement. Cette méthode, combinée aux mesures de fluorescence de la chlorophylle in vivo, constitue un outil très intéressant et apparement très efficace pour les sélectionneurs intéressés dans le criblage de plantes cultivées mieux adaptées aux contraintes du milieu. Une étude plus développée du mécanisme d'action de la chaleur sur l'appareil photosynthétique (voir Havaux et al., 1987b) nous a montré qu'un traitement à 42°C provoque de nombreux effets irréversibles au niveau de la chaîne de transfert d'électrons, résultant en des changements complexes et extrêmes dans la distribution d'énergie entre les deux photosystèmes.

effets des températures élevées peuvent varier Les considérablement suivant que le stress est appliqué lentement et progressivement (Havaux et al., 1987 b et c) ou très rapidement (choc thermique, voir Havaux et al., 1987d), que les températures sont très ou modérément élevées (Havaux & Lannoye, 1987). Dans ce dernier cas, on observe la mise en place de mécanismes de régulation de la ditribution d'énergie dans l'appareil photochimique sans diminution de l'activité de transfert d'électrons. Un choc thermique (par exemple, 48°C pendant 3 min) peut conduire à des réponses très surprenantes. Ainsi, un choc thermique appliqué à des feuilles de tabac résulte en une substitution (réversible par retour aux conditions normales de température ou par éclairement au moyen d'une forte lumière blanche) de l'activité normale de production . d'oxygène par une consommation spectaculaire d'oxygène (Fig. 33). Cette prise d'oxygène, détectée photoacoustiquement dans des feuilles stressées, peut être interprétée comme reflètant une stimulation de la photoréduction de O2 (réaction de Mehler (1951)) causée par

l'inhibition (dépendante de la lumière) du cycle de Calvin, indiquant que O2 peut agir comme un important accepteur d'électrons en conditions de stress. Pour plus de détails sur ce mécanisme, voir Havaux et al. (1987d).



Fig.32. Effets d'un traitement à 42°C sur le rapport A<sub>OX</sub>/A<sub>PT</sub> dans différents génotypes de haricot sensibles ou résistants à la chaleur: P. vulgaris cv. Mollekens (●), Hatives du Limbourg (o), Alabama (▲), Copper Wax (□), P. acutifolius var. latifolius (△) et P. lunatus cv. Forhook bush (■).

![](_page_56_Figure_3.jpeg)

8 Time at 48°C (min)

<u>Fig.33</u>. Changements du rapport  $A_{OX}/A_{PT}$  dans des disques de feuilles de tabac incubés à 48°C à l'obscurité (•). Avant les mesures photoacoustiques, certains disques (o) ont été éclairés par une lumière blanche de forte intensité (320 W m<sup>-2</sup>). Graphiques insérés: signaux photoacoustiques bruts (quadrature). A) témoins, B) 48°C pendant 3 min à l'obscurité, C) idem que B suivi d'une illumination avec la forte lumière blanche pendant 5 min. Lorsqu'on examine la réponse des végétaux au froid, il convient de distinguer deux gammes de températures: les températures fraîches (0-15°C) et les températures inférieures à 0°C (Lyons et al., 1979).

Il est prouvé que le site d'action primaire du gel dans les tissus végétaux se situe au niveau des membranes cellulaires (Steponkus, 1978; Lyons et al., 1979; Levitt, 1980). Les membranes thylacoïdiennes des chloroplastes ont été énormément utilisées pour étudier les effets du gel sur les membranes des cellules végétales. La congélation in vitro de thylacoïdes (non protégés) résulte notamment en une perte de la capacité de tranfert d'électrons (Heber, 1967; Heber et al., 1973). Au niveau foliaire, le gel affecte l'allure des courbes d'induction de la fluorescence in vivo (Klosson & Krause, 1981) - un effet qui a été utilisé pour classer des céréales en fonction de leur tolérance au gel (Smillie & 1983). Une autre approche utilisable pour Hetherington, étudier la résistance au gel des plantes est fournie par des mesures "statiques" d'émission de lumière in vivo, c'est-à-dire des mesures des changements du niveau de fluorescence ou de luminescence à l'état stationnaire induits par la diminution de la température de la feuille (une méthode un peu similaire à celle du Fo utilisée pour la chaleur). Ces méthodes ont été employées pour détecter des génotypes résistants au gel dans un certain nombre d'espèces végétales (Sundbom & Öquist, 1982; Sundbom et al., 1982; Hallgren et al., 1982; Pukacki et al., 1983).

De nombreuses plantes cultivées de très grande importance économique, d'origine tropicale ou subtropicale, sont endommagées ou même tuées par des températures <u>positives</u> inférieures à environ 10-12°C (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Wang, 1982). Un des processus métaboliques les plus sensibles dans beaucoup de ces espèces est la photosynthèse. L'exposition au froid est associée à une forte diminution de la capacité de fixation du CO<sub>2</sub> (Long et al., 1983; Yakir et al., 1985), à des changements marqués dans l'ultrastructure des chloroplastes (Taylor & Craig, 1971) et à une inhibition des réactions photochimiques primaires (Baker et al., 1983; Havaux & Lannoye, 1984 et 1985a, Kee et al., 1986). En utilisant un petit fluorimètre portable, Smillie et collaborateurs ont mis au point une technique assez simple pour suivre l'inactivation progressive du PS II dans des feuilles de plantes sensibles placées à 0°C en utilisant comme indicateur le taux maximum d'augmentation de la fluorescence variable induite,  $R_{\rm F}$ = (dF<sub>V</sub>/dt)max (Smillie & Hetherington, 1983; Hetherington et al., 1983a; Smillie et al., 1983). Ces auteurs ont également utilisé ce paramètre  $R_{\rm F}$  comme base de tests de criblage de variétés de plantes (normalement sensibles) mieux adaptées au froid.

Bien que beaucoup d'efforts aient été faits pour étudier les répercussions d'un traitement au froid sur l'activité photosynthétique, relativement peu de choses sont connues en ce qui concerne le fonctionnement in vivo des membranes chloroplastiques à basse température. Cet aspect des maladies physiologiques du froid est important à étudier étant donné qu'il a été suggéré que les causes de la sensibilité aux températures fraîches se trouvent au niveau des membranes cellulaires (Lyons, 1973; Lyons et al., 1979; Levitt, 1980). Sans entrer dans les détails, l'hypothèse est qu'à basse température, certains constituants de la matrice lipidique des membranes (peut-être, le phosphatidylglycerole, Murata & Yamaya, 1984) se solidifieraient, entraînant une inhibition du fonctionnement de ces membranes qui conduirait à toute une série d'effets secondaires dommageables et finallement, après exposition prolongée au froid, à la mort de l'organisme.

Les techniques de fluorescence modulée fournissent un outil pouvant examiner la validité de cette hypothèse "de la transition de phase". La modulation de la fluorescence permet d'estimer la réoxydation des  $Q_A^-$  (par l'utilisation d'éclairs de lumière saturante, voir Schreiber et al., 1986) ainsi que les transitions état l-état 2 (voir Malkin et al., 1986a)- deux phénomènes qui sont supposés impliquer la diffusion de molécules ou de complexes moléculaires (plastoquinone dans le premier cas et LHCP dans le deuxième) dans la matrice lipidique des membranes thylacoïdiennes (Barber, 1983). S'il y a changement des propriétés physiques des membranes (du type transition de phase lipidique), on peut penser que cela doit inévitablement se répercuter au niveau de ces deux phénomènes. Des expériences in vitro ont d'ailleurs montré que la réduction artificielle de la fluidité des membranes thylacoïdiennes résulte en une inhibition du tranfert d'électrons et de la vitesse d'oxydation de  $Q_A^-$  à l'obscurité (Yamamoto et al., 1981; Vigh et al., 1985; Scoufflaire et al., 1985) ainsi que des changements d'état (Haworth, 1983).

figure 34A montre l'évolution de la composante La photochimique de l'extinction de la fluorescence chlorophyllienne (qQ, déterminée au moyen de la technique de fluorescence modulée de Schreiber et al. (1986)- voir Introduction, p.10) pendant les changements lents PSMT de l'induction de la fluorescence dans des feuilles de mais (var. Alsa) placées à différentes températures. En réalité, c'est 1-qo qui a été représenté car ce paramètre est un indicateur du niveau de réduction de QA. On peut voir que les basses températures ont fortement inhibé la réoxydation de QAT. Cet effet est particulièrement visible à l'état stationnaire. Au contraire, le niveau de réduction de QA à l'état stationnaire n'a pas été modifié par les basses températures dans les feuilles d'une plante résistante au froid comme le pois (Fig. 34B). L'extinction photochimique de la fluorescence semble donc être un indicateur de la tolérance au froid des plantes. Ceci a été confirmé par la mesure de q<sub>O</sub> dans les feuilles de toute une série d'espèces végétales, sensibles ou résistantes au froid, soumises à un traitement au froid (Tableau 3). Ce paramètre q<sub>0</sub> a également permis de classer des lignées de maïs en fonction de leur resistance relative aux basses températures (Havaux, 1987a). La méthode du q<sub>O</sub> est particulièrement intéressante pour des programmes de sélection portant sur de grandes populations de plantes car elle fournit un indicateur très précoce de changements physiologiques dans les membranes et ne nécessite aucun prétraitement.

Cette augmentation de la concentration en  $Q_A^-$  dans les feuilles de maïs exposées au froid s'est révélée être fortement dépendante de l'intensité de la lumière actinique utilisée pour induire l'effet Kautsky (Fig. 35). Apparemment, dans les feuilles de maïs, le transport d'électrons à basse

![](_page_60_Figure_0.jpeg)

<u>Fig.34</u>. Changements de la valeur de  $1-q_Q$  pendant les changements lents (de P à T) de l'induction de la fluorescence de la chlorophylle dans des feuilles de A) maïs (cv. Alsa) à 26, 11, 5 et l°C et de B) pois à 26, 10 et 2.5°C.

![](_page_60_Figure_2.jpeg)

<u>Fig.35</u>. Niveau de réduction de  $Q_A$  (estimé par  $1-q_Q$ ) dans les feuilles de maïs (cv. Alsa) photosynthétisant à l'état stationnaire en fonction de la densité du flux de photons de la lumière (blanche) utilisée pour induire l'effet Kautsky. Température de la feuille: 26 (o), 10 ( $\Box$ ) et 4°C (o).

### TABLEAU 3 Effet du froid (4°C) sur la valeur de q<sub>Q</sub> à l'état stationnaire dans les feuilles ou les fruits de différentes espèces végétales sensibles ou résistantes au froid. Les valeurs sont exprimées en % des témoins à 25°C.

Espèces	q <sub>Q</sub> (%)	
Résistantes au froid		
Pois	95	
Orge	90	
Houx	95	
Epicéa	100	
Troène	100	
Sensibles		
Coton	33	
Ficus sp.	38	
Avocat, fruit	36	
feuille	66	
Haricot	62	
Mats	56	
Papaye	55	
Tomate	86	

température est rapidement saturé à des densités de flux de photons relativement basses (à 4°C, la saturation apparaît à environ 500  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Cet effet pourrait expliquer la sensibilisation à la photoinhibition constatée très souvent dans les plantes thermophiles soumises au froid (Öquist, 1983; Long et al., 1983; Powles et al., 1983; Yakir et al., 1985), étant donné que cette saturation de la photochimie peut conduire rapidement à une situation où l'absorption de l'énergie lumineuse dépasse largement les capacités de dissipation.

L'inhibition de la réoxydation des Q4<sup>-</sup> dans les feuilles de mais exposées au froid pourrait résulter d'une possible solidification partielle des lipides des membranes thylacoïdiennes inhibant la diffusion à longue distance des plastoquinones et des plastocyanines dans la matrice lipidique. Toutefois, une simulation par ordinateur a récemment démontré que le flux d'électrons entre le PS II et le PS I est régulé par de nombreuses réactions et qu'un seul facteur (diffusion, par exemple) n'exerce pas un contrôle total (Mauro et al., 1986). L'inhibition de l'oxydation de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> peut donc très bien résulter d'autres facteurs tels que des changements au niveau du gradient de protons photoinduit ou de l'activité de photophosphorylation. En étudiant l'influence de la température sur les changements d'état dans des feuilles de diverses espèces sensibles au froid (Havaux & Lannoye, 1987; Havaux, 1987b), nous avons observé que, contrairement à ce que prédit l'hypothèse de la transition de phase lipidique, le changement de l'état 2 vers l'état l non seulement n'est pas inhibé aux basses températures mais est fortement stimulé. Un résultat qui semble donc infirmer le modèle suivant lequel les lipides membranaires subiraient une transition de phase aux basses températures positives dans les espèces thermophiles et donner raison à ses détracteurs qui semblent d'ailleurs être de plus en plus nombreux (Graham & Patterson, 1982; Martin, 1986; Bishop, 1986).

En utilisant la méthode du  $q_Q$  présentée ci-dessus pour déterminer la résistance au froid et à la chaleur, nous avons observé que ces deux types de résistance sont inversément corrélés chez le peulier (Fig. 36). Le clone de peuplier le plus résistant à la chaleur (Robusta) est aussi le plus sensible au froid. Cette corrélation inverse a également été observée par d'autres (Smillie et al., 1983; Hetherington et al., 1983b) dans d'autres espèces végétales et à l'aide d'autres techniques. Tout se passe comme si les plantes possèdent une gamme étroite de températures entre lesquelles elles peuvent survivre et que toute modification d'une des limites implique un changement correspondant de l'autre limite de température.

![](_page_63_Figure_1.jpeg)

<u>Fig.36</u>. Relation entre la résistance au froid (mesurée par la basse température induisant 25% de réduction de la valeur de  $q_Q$ ) et la résistance à la chaleur (estimée par la haute température induisant 25% de réduction de  $q_Q$ ) de 5 clones de peuplier (Ra, Raspalje; Rob, Robusta; Fp, Fritzi Pauley; Cr, Columbia River; Bp, Beaupré).

#### V. LUMIÈRE

Si la lumière est indispensable à la photosynthèse et donc à la vie des plantes, un excès d'énergie lumineuse par rapport à ce que la feuille peut dissiper est toutefois extrêmement dommageable pour l'appareil photosynthétique. C'est le processus de photoinhibition qui se manifeste généralement quand l'activité photosynthétique est réduite par des conditions défavorables de l'environnement (Powles, 1984). Bien que les mécanismes moléculaires de cette photodestruction de l'appareil photochimique des chloroplastes ne soient pas encore parfaitement élucidés, il semble établi toutefois que les dégâts soient localisés au niveau du PS II. Il semble aussi que de nombreux mécanismes de régulation (transitions état 1- état 2, transitions état 2- état 3, émission de chaleur,...) fournissent une protection contre l'excès d'énergie d'excitation en conditions de stress (Powles, 1984; Satch & Fork, 1983; Satch et al., 1983; Fork & Satch, 1986; Havaux & Lannoye, 1987).

très basses intensités lumineuses sont également Les néfastes pour la croissance des plantes (en tout cas, pour les plantes dites "de lumière"). Cependant, il semble que les organismes végétaux possèdent la propriété de s'adapter aux faibles lumières et de modifier les caractéristiques de leur appareil photosynthétique en conséquence. La morphologie, la physiologie, la biochimie et la structure des feuilles "d'ombre" sont connues pour être différentes de celles des feuilles "de lumière" (Boardman, 1977; Björkman, 1981; Lichtenthaler et al., 1981; Hodges & Barber, 1983). Ces différences peuvent également être observées, tout du moins en partie, entre les feuilles de plantes cultivées sous fortes et faibles intensités lumineuses (Lichtenthaler et al., 1981) ou même entre la face supérieure et la face inférieure d'une même feuille (Schreiber et al., 1977; Kulandaivelu et al., 1983). Nous avons déterminé, par des mesures photoacoustiques et fluorimétriques, les caractéristiques photosynthétiques des feuilles de différents clones de peuplier (Populus sp.) cultivés à des densités de flux de photons élévées et basses (rapport 5/1 entre les deux densités). Les détails de cette

études sont repris dans un long article (Havaux et al., 1987f). En résumé, on peut dire que tous les paramètres photosynthétiques mesurés ont été modifiés par la croissance des plantes à basse densité de flux photonique:

\* le contenu en chlorophylle (augmentation)

\* le rendement quantique maximum de la production d'oxygène photosynthétique (augmentation, voir Fig. 37A)

\* Le taux maximum de production d'oxygène
 (diminution, voir Fig. 37B)

\* la composante photochimique de l'extinction de la fluorescence chlorophyllienne q<sub>0</sub> (diminution)

\* la composante non photochimique de l'extinction de la fluorescence q<sub>E</sub> (légère augmentation)

\* la taille des unités photosynthétiques du PS II
(augmentation)

\* les transitions état l-état 2 (stimulation)

Ces différentes modifications permettent une optimalisation de l'utilisation de l'énergie absorbée et un meilleur fonctionnement de l'appareil photochimique des chloroplastes sous faibles lumières (avec comme corollaire, une diminution de son efficience aux intensités lumineuses élevées). Tous les clones ont présenté les mêmes changements bien que l'amplitude de ces changements aie été différente d'un clone à l'autre. Ce qui indique qu'il existe chez le peuplier une assez grande variabilité génétique en ce qui concerne l'adaptation aux basses intensités lumineuses.

![](_page_66_Figure_0.jpeg)

<u>Fig.37</u>. Production d'oxygène photosynthétique mesurée par photoacoustique dans les feuilles de peuplier (Fritzi Pauley) cultivées à basse (environ 150  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) et haute (800  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) densité de flux de photons. A) Rendement quantique de la production d'oxygène en fonction de la densité de flux de photons de la lumière blanche continue. B) Production d'oxygène (valeurs relatives) en fonction de la densité de flux de photons de la lumière continue.

■,□ , respectivement basse et haute densité de flux de photons.

Les divers exemples présentés dans les chapitres précédents montrent très clairement qu'une altération de l'état physiologique des plantes, causée par des conditions défavorables de l'environnement, se reflète rapidement au niveau des signaux lumineux et thermiques émis par les feuilles. Bien que ces signaux, et en particulier l'émission de fluorescence chlorophyllienne in vivo, soient une fonction complexe d'un grand nombre de paramètres physiologiques qui interagissent entre eux, un choix judicieux de conditions expérimentales adéquates et d'une méthodologie appropriée permet d'obtenir des informations valables (et présentant un intérêt directement pratique) sur les propriétés fonctionnelles des membranes chloroplastiques in vivo. Les avantages inhérents aux méthodes biophysiques présentées dans ce travail (fluorescence in vivo et photoacoustique), à savoir extrême rapidité, l'utilisation de très petits une échantillons, un rapport signal/bruit élevé. une miniaturisation et une portabilité de l'équipement, et un caractère non destructif, fournissent un système de test et de criblage qui, très probablement, ne peut être égalé par aucune autre méthode utilisée en physiologie végétale. Si l'on reprend l'exemple de la mesure du degré de résistance à la sécheresse chez le blé (chapitre IID), le classement des variétés par des mesures agronomiques classiques a necessité quatre années d'expériences en plein champ (P. Grignac, Comm. Pers., 1987) alors que le même classement réalisé par des mesures de fluorescence n'a pris que quelques heures (4 h de déshydratation des échantillons foliaires + quelques minutes pour l'enregistrement des courbes de fluorescence). La possibilité de détecter précocement les effets d'un stress hydrique sur la physiologie des plantes pourrait permettre d'utiliser de certains paramètres fluorescence chlorophyllienne pour le pilotage de programmes d'irrigation. idée de "bio-programmation" de l'irrigation est Cette actuellement à l'étude en utilisant notamment la valeur de qo comme paramètre, étant donné qu'il peut être mesuré en présence de la lumière solaire (puisqu'il s'agit d'une

méthode de fluorescence modulée).

L'intérêt des méthodes fluorimétriques pourrait être encore fortement augmenté par un calibrage au moyen de mesures plus directes de l'activité photosynthétique (production d'oxygène, fixation du CO2). En ce qui concerne la détection photoacoustique, des études préliminaires ont déjà montré une bonne corrélation avec les techniques d'analyse de gaz (CO<sub>2</sub>) en système fermé (du type IRGA) (Yakir et al., 1985; Canaani et al., 1985b). Il nous semble d'ailleurs que l'avenir est dans l'utilisation simultanée de nombreuses methodes biophysiques (celles envisagées dans cette thèse, combinées éventuellement à d'autres techniques in vivo fournissant des informations complémentaires sur l'état de l'appareil photosynthétique comme, par exemple, la mesure de la dispersion par les feuilles de la lumière à 535 nm qui est supposée refléter le gradient de pH photoinduit (Heber, 1969)). De cette manière, les mécanismes complexes par lesquels les facteurs de l'environnement modulent l'activité des chloroplastes pourront être encore mieux compris. Un travail de fin d'études réalisé récemment au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'ULB (voir P. Cerulus, 1987), basé sur les idées développées dans cette thèse, a d'ailleurs montré qu'une bonne classification de génotypes de mais en fonction de leur tolérance relative au froid nécessite l'utilisation de plusieurs tests menés en parallèle. Dans ce cas, l'adaptation de techniques d'analyse statistique appropriées (analyse multivariée) est évidemment impérative.

Des méthodes de criblage efficaces sont absolument indispensables pour permettre un développement rapide des nouvelles techniques de biologie moléculaire. En effet, un outil "de fin de chaîne" est nécessaire pour caractériser rapidement les mutants obtenus par manipulation génétique. La création de mutants photosynthétiques apparaît d'ailleurs être une nouvelle approche intéressante pour étudier les processus de contrôle de l'activité photochimique des chloroplastes. De tels mutants peuvent être induits par différentes techniques relativement simples (rayons X, substances chimiques mutagènes, ...- voir à ce sujet Miles, 1982). Après caractérisation des effets du traitement mutagène sur l'appareil photosynthétique, l'interaction de la mutation avec

les facteurs de l'environnement peut être analysée, permettant peut-être de mieux comprendre la modulation de l'activité photosynthétique par l'environnement. Avant que l'on puisse créer artificiellement par génie génétique de nouveaux cultivars "améliorés", il est indispensable de développer des techniques appropriées pour le transfert de gènes bien précis et d'identifier les processus physiologiques clés et les réactions biochimiques qui doivent être modifiés. Bien que l'on ne connaisse pas encore très clairement quelles protéines spécifiques doivent faire l'objet de manipulations génétiques de manière à produire des plantes plus productives et mieux adaptées à l'environnement, il existe déjà quelques exemples où la biologie moléculaire a un impact considérable (Barber & Marder, 1986). Un exemple de mutation de l'appareil photosynthétique bien connue est la mutation liée à la résistance aux herbicides du type S-triazine. Certaines mauvaises herbes ont en effet acquis par sélection naturelle la propriété de résister à l'atrazine . Cette résistance à l'atrazine est attribuée au changement d'un seul acide aminé (remplacement d'une sérine par une glycine) dans la molécule Dl du PS II, qui est le site de fixation de l'herbicide ainsi que de QB (Pfister & Arntzen, 1979; Trebst, 1987). Bowes et al. (1980) ont montré que ce changement résulte en un ralentissement substantiel du transfert d'électrons entre QA et QB dans des chloroplastes isolés. Comme le montre la figure 38, cette mutation résulte également en une diminution très marquée du rendement quantique de la production d'oxygène photosynthétique in vivo. Toutefois, il n'est pas sûr que cette altération du transport d'électrons résulte nécessairement en une réduction de l'assimilation photosynthétique du CO2. En effet, Jansen et al. (1986) ont montré que l'activité de fixation du CO2 et la croissance sont plus grandes chez des biotypes de Chenopodium album résistants à l'atrazine que chez des sensibles. D'autre part, et al. (1983) ont observé une diminution du taux Ort d'assimilation du CO2 maximum (à la saturation en lumière) dans des biotypes résistants d'Amaranthus hybridus mais, d'après eux, ce taux plus faible n'est pas limité par la capacité de transfert d'électrons et n'est donc pas une conséquence directe des facteurs qui confèrent la résistance à

64

l'atrazine. Comme on le voit, une mutation ponctuelle peut avoir des répercussions considérables au niveau des processus photochimiques primaires et l'interaction entre ces modifications de la photochimie primaire et l'activité photosynthétique "finale" semble être très complexe.

![](_page_70_Figure_1.jpeg)

<u>Fig.38</u>. Logarithme du rendement quantique de la production d'oxygène  $(A_{OX}/A_{PT})$  en fonction de la racine carrée de la fréquence de modulation dans les feuilles d'Epilobium ciliatum résistant ou sensible à l'atrazine.

#### VII. RÉFERENCES CITÉES

ANDERSON JM, 1975. Biochim. Biophys. Acta, 416, 191-235. ANDERSON JM, 1981. FEBS Lett., 124, 1-10. ARMOND PA, SCHREIBER U, BJÖRKMAN O, 1978. Plant Physiol., 61, 411-415. ARMOND PA, BJORKMAN O, STAEHELIN LA, 1979. Carnegie Inst. Washington Yearb., 78, 292-293. ARNTZEN CJ, 1978. In: Current Topics in Bioenergetics, Vol. 8 (Sanadi R & Vernon LP, ed.) pp. 111-160, Academic Press, New York. BADGER MR, 1985. Ann. Rev. Plant Physiol., 36, 27-53. BAKER NR, EAST TM, LONG SP, 1983. J. Exp Bot., 34, 189-197. BARBER J. KRAAN G.P.B., 1970. Biochim. Biophys. Acta, 197, 49-59. BARBER J, 1983. Plant Cell Environ., 6, 311-322. BARBER J, MARDER JB, 1986. In: Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, vol. 4 (GE Russel, ed.) pp. 355-404, Pub. Intercept Ltd. BELL AG, 1880. Amer. J. Science, 20, 305. BELL AG, 1881. Phil. Mag., 11, 510-528. BEN G-Y, OSMOND CB, SHARKEY TD, 1987. Plant Physiol., 84, 476-482. BERRY J, BJORKMAN O, 1980. Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 491-543. BILGER W, SCHREIBER U, LANGE OL, 1984. Oecologia, 63, 256-262. BISHOP DG, ANDERSEN KS, SMILLIE RM, 1972. Plant Physiol., 49, 467-470. BISHOP DG, 1986. Plant Cell Environ., 9, 613-616. BJORKMAN 0, 1981. In: Encyclopedia of Plant Physiology, N.S., Vol. 12A (Lange OK, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds.) pp. 57-107, Sringer, Berlin. BJORKMAN O, POWLES SB, 1984. Planta, 161, 490-504. BJORKMAN O, DEMMIG B, 1987. Planta, 170, 489-504. BOARDMAN NK, 1977. Ann. Rev. Plant Physiol., 29, 355-377. BOWES J, CROFTS AR, ARNTZEN CJ, 1980. Arch. Biochem. Biophys., 200, 303-308. BOYER JS, 1971. Plant Physiol., 48, 532-536. BOYER JS, 1976. In: Water Deficit and Plant Growth (Kozlowski
TT, ed.) pp. 153-190, Academic Press, New York. BRASLAVSKY SE, 1986. Photochem. Photobiol., 43, 667-675. BRIANTAIS J-M, VERNOTTE C, KRAUSE GH, WEIS E, 1986. In: Light Emission by Plants and Bacteria (Govindjee et al., ed.) pp. 539-583, Academic Press, New York. BULTS G, NORDAL P-E, KANSTAD, SO, 1982. Biochim. Biophys. Acta, 682, 234-237. BULTS G, HORWITZ BA, MALKIN S, CAHEN D, 1982. Biochim. Biophys. Acta, 679, 452-465. BUSCHMANN C, PREHN H, 1983. Photobiochem. Photobiophys. Acta, 5, 63-69. BUSCHMANN C, PREHN H, LICHTENTHALER H, 1984. Photosyn. Res., 5, 29-46. BUTLER WL, KITAJIMA M, 1975a. Biochim. Biophys. Acta, 396, 72-85. BUTLER WL, KITAJIMA M, 1975b. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res., 3rd, 1974, pp. 13-24. BUTLER WL, STRASSER RJ, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 3382-3385. CANAANI O, MALKIN S, 1984. Biochim. Biophys. Acta, 766, 513-524. CANAANI O, MOTZAN Z, MALKIN S, 1985a. Planta, 164, 480-486. CANAANI O, HAVAUX M, CAHEN D, MALKIN S, YAKIR D, BRAVDO B-A, 1985b. In: Proceedings of the Fourth International Topical Meeting on Photoacoustic, Thermal, and Related Sciences. Ville d'Esterel, Québec, Canada. ThAll. CARPENTIER R, LARUE B, LEBLANC RM, 1984. Arch. Biochem. Biophys., 228, 534-543. CARPENTIER R, NAKATANI HY, LEBLANC RM, 1985. Biochim. Biophys. Acta, 808, 470-473. CERULUS P, 1987. Utilisation de paramètres photosynthétiques pour caractériser la résistance au froid chez le maïs. TFE, Laboratoire de Physiologie Végétale de l'ULB. CHOW WS, TELFER A, CHAPMAN DJ, BARBER J, 1981. Biochim. Biophys. Acta, 638, 60-68. CORNIC G, PRIOUL J-L, LOUASON G, 1983. Physiol. Plant., 58, 295-301. DELIEU TJ, WALKER DA, 1983. Plant Physiol., 73, 542-549. DEMMIG B, BJORKMAN 0, 1987. Planta, 171, 171-184. DEVLIN RM, ZBIEC II, MURKOWSKI AJ, KARCZMARCZYK SJ, 1980. Weed Res., 21, 133-136.

DIETZ KJ, SCHREIBER U, HEBER U, 1985. Planta, 166, 219-226. DUKE JA, 1978. In: Crop Tolerance to Sub-optimal Land Conditions (Jung GA, ed.) p. 1, Amer. Soc. Agron., Madison, WI. LMN, SWEERS HE, 1963. In: Microalgae DUYSENS and Photosynthetic Bacteria (Jpn. Soc. Plant Physiol., ed.) pp. 353-372, University of Tokyo Press, Tokyo. ELLENSON JL, AMUNDSON RG, 1982. Science, 215, 1104-1106. ELLENSON JL, 1985. Plant Physiol., 78, 904-908. ETIENNE A-L, 1986. Biochimie, 68, 471-479. EVANS EH. CROFTS AR. 1973. Biochim. Biophys. Acta, 292, 130-139. FORK DC, SATOH K, 1986. Ann. Rev. Plant Physiol., 37, 335-361. FORK DC, BOSE S, HERBERT SK, 1986. Photosyn. Res., 10, 327-333. FRY KE, 1970. Plant Physiol., 45, 465-469. GENTY B, BRIANTAIS J-M, VIEIRA DA SILVA JB, 1987. Plant Physiol., 83, 360-364. GIBBONS GC, SMILLIE RM, 1980. Carlsberg Res. Commun., 45, 269-282. GOEDHEER JC, 1972. Ann. Rev. Plant Physiol., 23, 87-112. GOUNARIS K, BRAIN APR, QUINN PJ, WILLIAMS WP, 1984. Biochim. Biophys. Acta, 766, 198-208. GOVINDJEE, GOVINDJEE R, 1975. In: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee ed.) pp. 1-50, Academic Press, New York. GOVINDJEE, DOWNTON WJS, FORK DC, ARMOND PA, 1981. Plant Sci. Lett., 20, 191-194. GRAF JA, 1987. Struktur-Functionsbeziehungen Zwischen Lipidmatrix und Pigment-Protein-Komplexen in Thylakoidmembranen. Thèse de Doctorat, Université de Stuttgart (RFA). GRAHAM D, PATTERSON BD, 1982. Ann. Rev. Plant Physiol., 35. 347-372. HALLGREN J-E, SUNDBOM E, STRAND M, 1982. Physiol. Plant., 54, 275-282. HAMZA M, 1980. Physiol. Vég., 18, 69-81. HARBINSON J, WOODWARD FI, 1987. Plant Cell Environ., 10, 131-140. HAVAUX M., 1980. Physiologie et biochimie de la résistance au

gel de l'orge (Hordeum distichum L.). TFE, Laboratoire de Physiologie Végétale, ULB. HAVAUX M, LANNOYE R, 1983a. Photosyn. Res., 4, 257-263. HAVAUX M, LANNOYE R, 1983b. Irrig. Sci., 4, 147-151. HAVAUX M., 1984. Adaptation au froid de l'orge (Hordeum vulgare L.): aspects physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat, Laboratoire de Physiologie Végétale, ULB. HAVAUX M, LANNOYE R, 1984. Photosynthetica, 18, 117-127. HAVAUX M, LANNOYE R, 1985a. Agronomie, 5, 331-337. HAVAUX M, LANNOYE R, 1985b. Z. Pflanzenzüchtg., 95, 1-13. HAVAUX M, LANNOYE R, 1985c. J. Agric. Sci., 104, 501-504. HAVAUX M, LANNOYE R, 1985d. Photosynthetica, 19, 388-396. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1986a. Plant Physiol., 82, 827-833. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1986b. Plant Physiol., 82, 834-839. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1987a. Physiol. Plant., 70, 503-510. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1987b. In: Progress in Photosynthesis Research, Vol. II (Biggins J, ed.) pp. 749-752, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1987c. Plant Sci., 48, 143-149. HAVAUX M, CANAANI O, MALKIN S, 1987d. Plant Cell Environ., 10, 677-683. HAVAUX M, LANNOYE R, 1987. Photosyn. Res., 14, 147-158. HAVAUX M, 1987a, Plant Physiol. Biochem., 25, sous presse. HAVAUX M, ERNEZ M, LANNOYE R, 1987e. Agronomie, sous presse. HAVAUX M, 1987b. Plant Physiol. Biochem., sous presse. HAVAUX M, ERNEZ M, LANNOYE R, 1987f. J. Plant Physiol., sous presse. HAVEMAN J, LAVOREL J, 1975. Biochim. Biophys. Acta, 408, 269-283. HAWORTH P, 1983. Arch. Biochem. Biophys., 226, 145-154. HEBER U, 1967. Plant Physiol., 42, 1343-1349. HEBER U, 1969. Biochim. Biophys. Acta, 180, 302-319. HEBER U, TYANKOVA L, SANTARIUS KA, 1973. Biochim. Biophys. Acta, 291, 23-27. HETHERINGTON SE, SMILLIE RM, HARDACRE AK, EAGLES HA, 1983a. Austr. J. Plant Physiol., 10, 247-256.

HETHERINGTON SE, SMILLIE RM, MALAGAMBA P, HUAMAN Z, 1983b. Planta, 159, 119-124. HODGES M. BARBER J. 1983. Planta, 157, 166-173. HUBAC C, VIEIRA DA SILVA J, 1980. Physiol. Vég., 18, 45-53. JANSEN MAK, HOBE JH, WESSELIUS JC, VAN RENSEN JJS, 1986. Physiol. Vég., 24, 475-484. JENNINGS RC, GARLASCHI FM, GEROLA PD, FORTI G, 1980. FEBS Lett., 117, 332-334. KANSTAD SO, CAHEN D, MALKIN S, 1983. Biochim. Biophys. Acta, 722, 182-189. KAUTSKY H, HIRSCH A, 1934. Biochem Z., 274, 422-434. KAUTSKY H, EBERLEIN R, 1939. Biochem Z., 302, 137-166. KEE SC, MARTIN B, ORT DR, 1986. Photosyn. Res., 8, 41-51. KLOSSON RJ, KRAUSE GH, 1981. Planta, 151, 347-352. KRAUSE GH, WEIS E, 1984. Photosyn. Res., 5, 139-158. KRIEDEMAN PE, DOWNTON WJS, 1981. In: The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (Paleg LG & Aspinall D, ed.) pp. 283-314, Academic Press, Sydney. KULANDAIVELU G, NOORUDEEN AM, SAMPATH P, PERIYANAN S, RAMAN K, 1983. Photosynthetica, 17, 204-209. LARUE B, LEBLANC RM, DESORMEAUX A, 1985. In: Proceedings of the 4th International Topical Meeting on Photoacoustic, Thermal and Related Sciences. Ville d'Esterel, Québec, Canada. ThA8. LAVOREL J, 1975. In: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee, ed.) pp. 223-317, Academic Press, New York. LAVOREL J, BRETON J, LUTZ M, 1986. In: Light Emission by and Bacteria (Govindjee et al., ed.) pp. 57-98, Plants Academic Press, new York. LEVITT J, 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol.1, Academic Press, New York. LICHTENTHALER HK, BUSCHMANN C, DÖLL M, FIETZ H-J, BACH T, KOZEL U, MEIER D, RAHMSDORF U, 1981. Photosyn. Res., 2, 115-141. LICHTENTHALER HK, BUSCHMANN C, RINDERLE U, SCHMUCK G, 1986. Radiat. Environ. Biophys., 25, 297-308. LONG SP, EAST TM, BAKER NR, 1983. J. Exp. Bot., 34, 177-188. LYONS JM, 1973. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 445-466. LYONS JM, RAISON JK, STEPONKUS PL, 1979. In: Low Temperature Stress in Crop Plants (Lyons JM, Graham D & Raison JK, ed.)

pp. 1-24, Academic Press, New York. MALKIN S, KOK B, 1966. Biochim. Biophys. Acta, 126, 413-432. MALKIN S, 1977. In: Primary Processes of Photosynthesis (Barber J, ed.) pp. 349-432, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. MALKIN S, CAHEN D, 1979. Photochem. Photobiol., 29, 803-813. MALKIN S, ARMOND PA, MOONEY HA, FORK DC, 1981. Plant Physiol., 67, 570-579. MALKIN S, TELFER A, BARBER J, 1986a. Biochim. Biophys. Acta, 848. 48-57. MALKIN S, CANAANI O, HAVAUX M, 1986b. Photosyn. Res., 10, 291-296. MALKIN S, 1987. Planta, 171, 65-72. McWILLIAMS JR, 1986. Austr. J. Plant Physiol., 13, 1-13. MARSH LE, DAVIS DW, 1985. Euphytica, 34, 431-. MARTIN B., 1986. Plant Cell Environ., 9, 323-331. MATORIN DN. ORTOIDZE TV. NIKOLAEV GM. VENEDIKTOV PS, RUBIN AB, 1982. Photosynthetica, 16, 226-233. MAURO S, LANNOYE R, VANDELOISE R, VANDER DONCKT E, 1986. Photobiochem. Photobiophys., 11, 83-94. MEDERSKI HJ, CHEN LH, CURRY RB, 1975. Plant Physiol., 55, 589-593. MEHLER AH, 1951. Arch. Biochem. Biophys., 33, 65-77. MELCAREK PK, CERNOHLAVEK LG, BROWN GN, 1977. Anal. Biochem., 82, 473-484. MILES CD, DANIEL DJ, 1973. Plant Sci. Lett., 1, 237-240. MILES D, 1982. In: Methods in Chloroplast Molecular Biology (Edelman et al., eds.) pp. 75-107, Elsevier, Amsterdam. MOHANTY P, BOYER JS, 1976. Plant Physiol., 57, 704-709. MOLDAU H, 1973. Photosynthetica, 7, 1-7. MOLL BA, 1987. Biochim. Biophys. Acta, 890, 205-214. MONNEVEUX P, NEMMAR M, 1986. Agronomie, 6, 583-590. MURATA N., NISHIMURA M., TAKAMIYA A., 1966. Biochim. Biophys. Acta, 120, 23-33. MURATA N., 1968. Biochim. Biophys. Acta, 162, 106-121. MURATA N, YAMAYA J, 1984. Plant Physiol., 74, 1016-1024. NEWTON BA, BAKER NR, LONG SP, LAWLOR DW, 1981. In: Photosynthesis VI (Akoyounoglou, ed.) pp. 209-218, Balaban International Science Services, Philadelphia. NORRISH R, KRIEDEMANN PE, WISKICH JT, 1983. Photosynthesis Res., 4, 213-227.

OGREN E. BAKER NR. 1985. Plant Cell Environ., 8, 539-547. OGREN E, OQUIST G, 1985. Planta, 166, 380-388. OMASA K, SHIMAZAKI K-E, AIGA I, LARCHER W, ONOE M, 1987. Plant Physiol., 84, 748-752. ONO TA, MURATA N, 1977. Biochim. Biophys. Acta, 460, 220-229. OQUIST G, 1983. Plant Cell Environ., 6, 281-300. ORT DR, AHRENS WH, MARTIN B, STOLLER EW, 1983. Plant Physiol., 72, 925-930. ORTIZ-LOPEZ A, ORT D, BOYER JS, 1987. In: Progress in Photosynthesis Research, Vol. IV (Biggins J, ed.) pp. 153-156, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. O'TOOLE JC, OZBURN JL, WALLACE HH, 1977. Plant Physiol., 40, 111-114. PANNEELS P, VAN MOER A, REIMER P, SALIS P, CHOUHIAT A, LANNOYE R, FIGEYS H, 1987. In: Progress in Photosynthesis Research, Vol. 3 (Biggins J ed.) pp. 827-830, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. PERCIVAL MP, BAKER NR, 1985. Plant Cell Environ., 8, 41-48. PFISTER K, ARNTZEN CJ, 1979. Z. Naturforsch., 34c, 996-1009. POULET P, CAHEN D, MALKIN S, 1983. Biochim. Biophys. Acta, 724, 433-446. POWLES SB, BERRY JA, BJORKMAN O, 1983. Plant Cell Environ., 6, 117-123. POWLES SB, 1984. Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 15-44. Ρ. VESELOVSKY VA, VESELOVA TV, 1983. Z. PUKACKI Pflanzenphysiol., 109, 267-273. QUICK P, HORTON P, 1984. Proc. R. Soc. London, Ser. B, 220, 371-382. RENGER G, GOVINDJEE, 1985. Photosynthesis Res., 6, 33-55. RENGER G, SCHREIBER U, 1986. In: Light Emission by Plants and Bacteria (Govindjee, Amesz J & Fork DC, ed.) pp. 587-619, Academic Press, New York. ROSENCWAIG A, 1980. Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy. Wiley, New York. SATOH K, FORK DC, 1983. Photosyn. Res., 4, 61-70. SATOH K, SMITH CM, FORK DC, 1983. Plant Physiol., 73, 643-647. SCHREIBER U, GROBERMAN L, VIDAVER W, 1975. Rev. Sci. Instrum., 46. 538-542. SCHREIBER U, FINK R, VIDAVER W, 1977. Planta, 133, 121-129.

SCHREIBER U, BERRY JA, 1977. Planta, 136, 233-238. SCHREIBER U, 1983. Photosynthesis Res., 4, 361-373. SCHREIBER U, BILGER W, 1985. In: NATO Advanced Research Workshop, Sesimbra, Portugal, Springer, Berlin. SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILGER W, 1986. Photosynthesis Res., 10, 51-62. SCHREIBER U, SCHLIWA U, 1987. Photosyn. Res., 11, 173-182. SCOUFFLAIRE C, LANNOYE R, BARBER J, 1985. Photosyn. Res., 6, 133-145. SHARKEY TD, BADGER MR, 1982. Planta, 156, 199-206. SIVAK MN, WALKER DA, 1985. In: Annual Report 1985 of the Institute for Photosynthesis, University of Research Sheffield, pp. 56-72. SMILLIE RM, 1979. Aust. J. Plant Physiol., 6, 121-133. SMILLIE RM, NOTT R, 1979. Aust. J. Plant Physiol., 6, 135-141. SMILLIE RM, GIBBONS GC, 1981. Carlsberg Res. Commun., 46, 395-403. SMILLIE RM, HETHERINGTON SE, 1983. Plant Physiol., 72, 1043-1050. SMILLIE RM, HETHERINGTON SE, OCHOA C, MALAGAMBA P, 1983. Planta, 159, 112-118. STEPONKUS PL, 1978. Adv. Agron., 30, 51-98. STRASSER RJ, 1981. In: Photosynthesis, Vol. 3, Structure and Molecular Organisation of Photosynthetic Apparatus (Akoyunoglou G, ed.) pp. 727-737, Balaban, Philadelphia. STREHLER BL, ARNOLD W, 1951. J. Gen. Physiol., 34, 809-820. SUNDBOM E, BJORN LO, 1977. Physiol. Plant., 40, 39-41. SUNDBOM E, OQUIST G, 1982. Plant Cell Physiol., 23, 1161-1167. SUNDBOM E, STRAND M, HALLGREN J-E, 1982. Plant Physiol., 70, 1299-1302. TREBST A, 1987. Z. Naturforsch., 42c, 742-750. TAYLOR AO, CRAIG AS, 1971. Plant Physiol., 47, 719-725. VIGH I, JOO F, DROPPA M, HORVATH LI, HORVATH G, 1985. Eur. J. Biochem., 47, 477-481. WALKER DA, HORTON P, SIVAK MN, QUICK WP, 1983a. Photobiochem. Photobiophys., 5, 35-39. WALKER DA, SIVAK MN, PRINSLEY RT, CHEESBROUGH JK, 1983b. Plant Physiol., 73, 542-549. WANG CY, 1982. HortScience, 17, 173-186. WEIS E, 1984. Plant Physiol., 74, 402-407.

WILLIAMS WP, ALLEN JF, 1987. Photosyn. Res., 13, 19-45. WILTENS J, SCHREIBER U, VIDAVER W, 1978. Can. J. Bot., 56, 2787-2794. WITT M, BARFIELD BJ, 1982. In: Handbook of Agricultural Productivity, Vol.1 (Rechcigl M, ed.) pp. 347-374, CRC Press, Boca Raton. WRAIGHT CA, CROFTS AR, 1971. Eur. J. Biochem., 19, 386-397. YAKIR D, RUDICH J, BRAVDO B-A, 1985. Planta, 164, 345-353. YAKIR D, RUDICH J, BRAVDO B-A, 1985. Planta, 164, 345-353. YAKIR D, RUDICH J, BRAVDO B-A, MALKIN S, 1986. Plant Cell Environ., 9, 581-588. YAMAMOTO Y, FORD RC, BARBER J, 1981. Plant Physiol., 67, 1069-1072. YOUNIS HM, BOYER JS, GOVINDJEE, 1979. Biochim. Biophys. Acta, 548, 328-340.

## VIII. LISTE DES PUBLICATIONS PERSONNELLES

 Havaux, M. & Lannoye, R. (1982) Changements biochimiques observés pendant l'adaptation au froid de l'orge. <u>Agronomie</u> 2, 923-930.

2) Havaux, M., Cleanis, C. & Lannoye, R. (1983) Effects of low temperatures on barley chloroplast membranes. In: Stress Effects on Photosynthesis (R. Marcelle, H. Clijsters & M. Van Poucke eds.); pp.267-276. Dr. W. Junk Publishers, The Hague/The Netherlands.

3) Havaux, M. & Lannoye, R. (1983) Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the phase transition of thylakoid membrane lipids. Photosynthesis Research 4, 257-263.

4) Havaux, M. & Lannoye, R. (1983) Chlorophyll fluorescence induction: a sensitive indicator of water stress in maize plants. Irrigation Science 4, 147-151.

5) Havaux, M., Lannoye, R., Chapman, D.J. & Barber, J. (1984) Alterations in chloroplast thylakoids during cold hardening of barley. In: Advances in Photosynthesis Research, Vol.4 (C. Sybesma ed.), pp. 459-462. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague/The Netherlands.

6) Havaux, M. & Lannoye, R. (1984) Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. Photosynthetica 18, 117-127.

7) Havaux, M., Barber, J., Chapman, D.J. & Lannoye, R. (1984) Changes in leaf and thylakoid membrane lipids during low-temperature adaptation of winter barley (<u>Hordeum vulgare</u> L.). Journal of Experimental Botany 35, 948-954.

8) Havaux, M. & Lannoye, R. (1985) Effets des basses températures positives sur les réactions photochimiques primaires de la photosynthèse du maïs (<u>Zea mays</u> L., cv. LG 9). Agronomie 5, 331-337. 9) Havaux, M. & Lannoye, R. (1985) <u>In vivo</u> chlorophyll fluorescence and delayed light emission as rapid screening techniques for stress tolerance in crop plants. <u>Zeitschrift</u> für Pflanzenzüchtung 95, 1-13.

10) Havaux, M. & Lannoye, R. (1985) Drought resistance of hard wheat cultivars measured by a rapid chlorophyll fluorescence test. Journal of Agricultural Science, Cambridge 104, 501-504.

11) Havaux, M. & Lannoye, R. (1985) Effects of dehydration on the photochemical function of thylakoids in bean leaves. Photosynthetica 19, 388-396.

12) Canaani, O., Havaux, M., Cahen, D., Malkin, S., Yakir, D. & Bravdo, B.-A. (1985) Characterization of photoacoustic parameters which are used as indicators for stress conditions. In: Proceedings of the 4th International Topical Meeting on Photoacoustic, Thermal and Related Sciences, Quebec, Canada. ThAll.

13) Lannoye, R., Havaux, M. & Reimer, P. (1986) <u>In vivo</u> chlorophyll fluorescence as a rapid screening technique for drought resistance in durum wheat. In: Proceedings of the International Symposium on Durum Wheat:"Applied Research and Export of Industrial Products", May 1985, Foggia, Italy. Pp. 175-181.

14) Canaani, O., Havaux, M. & Malkin, S. (1986) Hydroxylamine, hydrazine and methylamine donate electrons to the photooxidizing side of photosystem II in leaves inhibited in oxygen evolution due to water stress. <u>Biochimica Biophysica</u> Acta 851, 151-155.

15) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, S. (1986) Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustics and related methods. I. Probing the photoacoustic method as an indicator for water stress in vivo. Plant Physiology 82, 827-833. 16) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, M. (1986) Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustics and related methods. II. The effect of rapid drought on the electron transport and the relative activities of the two photosystems. Plant Physiology 82, 834-839.

17) Malkin, S., Canaani, O. & Havaux, M. (1986) Analysis of Emerson enhancement under conditions where photosystem II is inhibited - Are the two photosystems indeed separated? Photosynthesis Research 10, 291-296.

18) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, S. (1987) Rapid Screening for heat tolerance in <u>Phaseolus</u> species using the photoacoustic technique. Plant Science 48, 143-149.

19) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, S. (1987) Extreme changes in the distribution of excitation energy in the photochemical apparatus of intact leaves induced by progressive heat stress. In: Proceedings of the 7th International Congress on Photosynthesis (August 1986, Providence, USA). Vol. 2, pp. 749-752. Dordrecht: Martinus Nijhoff/ Dr Junk Publishers.

20) Havaux, M., Ernez, M. & Lannoye, R. (1987) Genetic variation in stress tolerance of the photosynthetic apparatus among poplar and hard wheat species assessed by <u>in vivo</u> chlorophyll fluorescence measurements. In: Proceedings of the OECD Workshop, The Genetics and Physiology of Photosynthesis and Crop Yield. Cambridge (U.K.), 20-24 July 1987, pp. 59-60.

21) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, S. (1987) Inhibition of photosynthetic activities under slow water stress measured in vivo by the photoacoustic method. <u>Physiologia Plantarum</u> 70, 503-510.

22) Havaux, M. & Lannoye, R. (1987) Reversible effects of moderately elevated temperature on the distribution of excitation enrgy between the two photosystems of photosynthesis in intact avocado leaves. <u>Photosynthesis</u> <u>Research</u> 14, 147-158. 23) Havaux, M. (1987) Effects of chilling on the redox state of the primary electron  $Q_A$  of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species. <u>Plant</u> Physiology and Biochemistry 25 (6) (in press).

24) Havaux, M., Canaani, O. & Malkin, S. (1987) Oxygen uptake by tobacco leaves after heat shock. <u>Plant, Cell and</u> <u>Environment</u> 10, 677-683.

25) Havaux, M., Ernez, M. & Lannoye, R. (1987) Tolerance of poplar (<u>Populus</u> sp.) to environmental stresses. I. Comparative study of poplar clones using the <u>in vivo</u> chlorophyll fluorescence method. <u>Acta Oecologia. Oecologia Plantarum</u> (in press).

26) Havaux, M. (1987) Effects of temperature on the transitions between state 1 and state 2 in intact maize leaves. Plant Physiology and Biochemistry (in press).

27) Havaux, M., Ernez, M. & Lannoye, R. (1987) Sélection de variétés de blé dur (<u>Triticum durum Desf.</u>) et de blé tendre (<u>Triticum aestivum</u> L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle <u>in vivo</u>. Agronomie (in press).

28) Havaux, M., Ernez, M. & Lannoye, R. (1987) Tolerance of poplar (<u>Populus</u> sp.) to environmental stresses. II. Photosynthetic caracteristics of poplar clones grown at low and high light intensities. <u>Journal of Plant Physiology</u> (in press).