

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
EMILIE CADET

DETECTION ET DISCRIMINATION DES CARENCES EN N, P ET K  
PAR LA FLUORESCENCE INDUIITE PAR UV CHEZ LE TOURNESOL  
NAIN (*Helianthus annuus*, « Sunspot »)

DECEMBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier Guy Samson pour son encadrement et son soutien tout au long de ma maîtrise, le CRNSG, ainsi que toute l'équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR.

## LISTE DES ABREVIATIONS

FBV : Fluorescence bleu-vert

FChl : Fluorescence chlorophyllienne

FChl<sub>BL</sub> : Fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue

FChl<sub>UV</sub> : Fluorescence chlorophyllienne induite par rayonnement UV

FR : Fluorescence chlorophyllienne émise dans les longueurs d'onde rouge

FRL : Fluorescence chlorophyllienne émise dans les longueurs d'onde rouge  
lointain

F685 : Fluorescence chlorophyllienne émise à 685 nm

F735 : Fluorescence chlorophyllienne émise à 735 nm

TEUV : Transmittance UV de l'épiderme ( $FChl_{UV}/[FChl_{BL}]$ )

logFER : Fluorescence excitation ratio ( $\log[FChl_{BL}/ FChl_{UV}]$ )

Pmax : Taux maximum de photosynthèse nette

## RÉSUMÉ

Afin de répondre à l'enjeu que représentent la pollution et les coûts reliés à l'utilisation des fertilisants chimiques pour l'agriculture, il convient de développer des méthodes de gestion localisée des champs, tenant compte de leur hétérogénéité spatiale. Les outils de diagnostic doivent être efficaces et rapides, i.e. capables d'estimer en temps réel les besoins nutritionnels des cultures. Récemment, la fluorescence induite par UV est apparue comme un outil optique prometteur pour estimer l'état physiologique des végétaux et particulièrement pour la détection des carences minérales. L'absorption de radiations UV par des feuilles vertes induit l'émission de deux types de fluorescences distinctes mais hautement complémentaires: la fluorescence bleu-vert (FBV) émise principalement par des composés phénoliques et la fluorescence chlorophyllienne (FChl), émise uniquement par la chlorophylle-a. Les intensités relatives des FBV et FChl sont déterminées par les composantes et les propriétés internes des feuilles, qui elles dépendent de l'état physiologique des végétaux et de leur réponse aux facteurs environnementaux. Dans ce contexte, les objectifs du projet de maîtrise étaient de :

- 1) Déterminer la capacité de la fluorescence induite par UV à non seulement détecter mais aussi discriminer les carences en N, P et K chez des plants de tournesol nain (*Helianthus annuus*) démontrant des inhibitions similaires de croissance.
- 2) Évaluer la capacité de la fluorescence à détecter précocement les différentes carences par rapport à l'inhibition de croissance et à l'apparition de symptômes visuels.
- 3) Établir une base physiologique pouvant supporter la détection des carences minérales par la fluorescence, en établissant une relation de cause à effet depuis les inhibitions de croissance jusqu'aux variations de fluorescence.

Dans une première expérience, des plants de tournesol ont été cultivés en présence de solutions minérales complètes ou déficientes en N, P ou K causant une inhibition similaire de la croissance de la jeune feuille #4 (environ 50% par

rapport à celles des plants contrôles). Les mesures effectuées avec un système d'imagerie de fluorescence ont permis distinguer les carences en N, P et K. La carence en K était la seule à causer une hausse significative de la FBV. Les carences en N et P causaient toutes deux une diminution de la transmittance UV de l'épiderme (estimée par le ratio des FChls induites par UV et par lumière bleue). Seule la carence en P causait une diminution du ratio F685/F735, soit le ratio des intensités de FChl émise à 685 et 735 nm : ce ratio est inversement relié à la concentration foliaire en chlorophylles. L'analyse des images de fluorescence a montré que la hausse de la FBV chez les feuilles carencées en K était localisée à l'apex des feuilles, dans une zone correspondant à une baisse de la concentration en chlorophylles.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué la précocité de la fluorodétection des carences en N, P et K et tenté d'établir une base physiologique pouvant expliquer les variations de fluorescence causées par ces carences. Nous avons donc comparé les paramètres de biomasse, de photosynthèse et concentrations en composés phénoliques afin d'établir un lien de cause à effet depuis les inhibitions de croissance jusqu'aux variations de fluorescence. Dans le cas des carences en N et P, les variations significatives de fluorescence apparaissent avant ou en même temps que les premières inhibitions significatives de diminution de croissance. Ceci permet d'affirmer que la fluorescence est sensible, i.e. peut détecter précocement les carences en N et en P. Par contre, dans le cas de la carence en K, aucune variation significative n'a été détectée dans ces expériences où l'inhibition de la croissance de la feuille #4 était moindre que lors de la première série d'expérience. Nos résultats indiquent donc que l'efficacité de la fluorescence à détecter les carences varie ainsi : N> P >> K.

D'un point de vue physiologique, les variations de fluorescence observées étaient principalement dues à l'accumulation de composés phénoliques car la concentration en chlorophylles n'a pas varié de façon significative pour les carences en N, P et K imposées. Dans le cas des carences en N et en P, nous pouvons expliquer l'augmentation de la concentration en composés phénoliques

par le modèle de la balance Carbone/Nutriments. Selon ce modèle, une inhibition de croissance plus grande et antérieure à l'inhibition de la photosynthèse cause un excès de carbone réduits (sucres), favorisant la synthèse des composés phénoliques qui eux déterminent les émissions de FBV et FChl.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Contexte général et problématique .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Objectifs .....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 La fluorescence chlorophyllienne (FChl).....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 La fluorescence bleu-vert (FBV).....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Les ratios de fluorescence.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1 Le ratio FR/FRL (F685/F735).....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2 Le ratio FBV/FChl<sub>UV</sub>.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.3 L'absorbance UV de l'épiderme (LogFER).....</b>	<b>12</b>
<b>2.4 L'imagerie de fluorescence .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Facteurs physiologiques et environnementaux faisant varier les émissions de fluorescence.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.1 Le stade de développement.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.2 Les principaux facteurs de stress environnementaux .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.3 Les variations de fluorescence en réponse aux carences minérales .</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Aspect physiologique des composés phénoliques .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6.1 Rôle de protection contre les stress biotiques et abiotiques .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6.2 Modèle physiologique expliquant la variation des composés phénoliques lors de carences minérales .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Rôles physiologiques des éléments N, P et K.....</b>	<b>23</b>
<b>2.7.1 L'azote (N).....</b>	<b>23</b>
<b>2.7.2 Le phosphore (P) .....</b>	<b>24</b>

<b>2.7.3 Le Potassium (K).....</b>	<b>25</b>
<b>CHAPITRE 3 DÉTECTION ET DISCRIMINATION DES CARENCES EN N, P ET EN K CHEZ LE TOURNESOL <i>Helianthus annuus</i> PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCES.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Matériel et Méthodes .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1 Matériel végétal et conditions de croissance .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2 Dispositif expérimental.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3 Mesures de surface foliaire .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.4 Mesures de fluorescence .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Résultats .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Discussion.....</b>	<b>37</b>
<b>CHAPITRE 4 PRECOCITE DE DETECTION DES CARENCES MINERALES PAR LA FLUORESCENCE ET BASE PHYSIOLOGIQUE SUPPORTANT LES VARIATIONS DE FLUORESCENCE .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Matériel et méthodes .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.1 Dispositif expérimental.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.2 Mesures de biomasse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3 Mesures de photosynthèse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.4 Mesures de fluorescence .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.5 Mesures des contenus foliaires en pigments photosynthétiques et en composés phénoliques solubles.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Résultats .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.1 Carence en azote .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.2 Carence en phosphore .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3 Carence en potassium.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>4.4.1 Précocité de la fluorescence à détecter les carences minérales.....</b>	<b>59</b>
<b>4.4.2 Base physiologique de l'interprétation de la fluorodétection des carences minérales.....</b>	<b>60</b>

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>65</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

2.1 Effets de différents facteurs de stress sur les ratios de fluorescence FBV/F685, FBV /F735 et F685/F735 .....	18
3.1 Effets des carences minérales N, P et K sur l'intensité et la distribution des intensités et des ratios de fluorescence.....	40

## LISTE DES FIGURES

1.1 Spectre typique de la fluorescence émise par une feuille de dicotylédone excitée par UV .....	2
2.1 Chevauchement entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission de fluorescence de la chlorophylle dans les feuilles .....	9
2.2 Relation curvilinéaire inverse entre le ratio F685/F735 et la concentration en chlorophylles dans des feuilles de hêtre et de bouleau.....	10
2.3 Modèle montrant le taux de croissance relatif (RGRr), le taux net d'assimilations, et la production de métabolites secondaires.....	23
3.1 Système d'imagerie utilisé pour mesurer les intensités de fluorescence au niveau de la feuille entière .....	30
3.2 Surfaces des feuilles 2 (feuille mature) et des feuilles 4 (jeune feuille) des plants contrôles et carencés en N, P et K .....	31
3.3 Paramètres de fluorescence des plants contrôles (T) et des plants carencés (N, P et K).....	33
3.4 Images de la FBV émise par des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K .....	34
3.5 Images du ratio FR/FRL des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K .....	35
3.6 Images du ratio $F\text{Chl}_{\text{UV}} /F\text{Chl}_{\text{BL}}$ (transmittance UV de l'épiderme) des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K .....	36
4.1 Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement.....	50

4.2 Taux maximum de photosynthèse , concentrations en chlorophylles et concentrations en composés phénoliques solubles des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement.	51
4.3 Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement .....	52
4.4 Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement.....	53
4.5 Taux maximum de photosynthèse, concentrations en chlorophylles et concentrations en composés phénoliques solubles des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement.....	54
4.6 Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement.....	55
4.7 Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement.....	56
4.8 Taux maximum de photosynthèse, concentrations en chlorophylles, concentrations en composés phénoliques solubles des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement.....	57
4.9 Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement.....	58

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

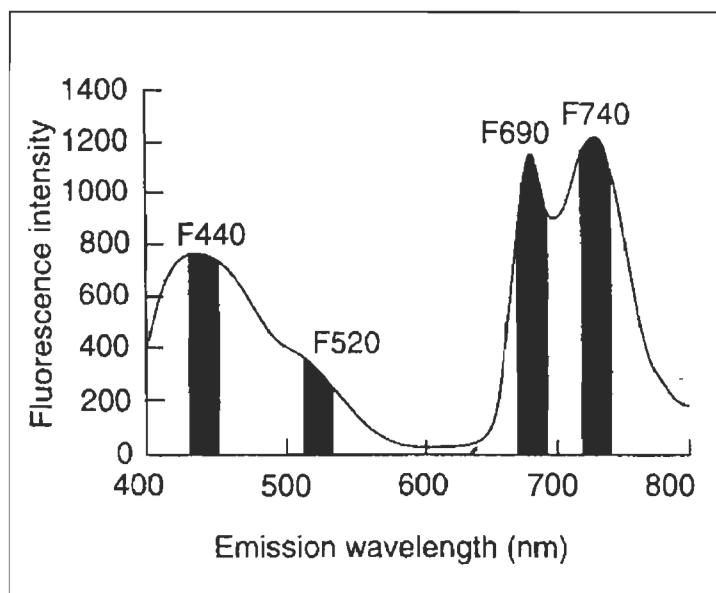
#### 1.1 Contexte général et problématique

Face aux pressions économiques et démographiques de plus en plus importantes, l'agriculture doit relever un véritable défi : augmenter la productivité des récoltes dans le respect de l'environnement. Cet enjeu opposant la productivité agricole à la qualité environnementale est particulièrement clair dans le cas des fertilisants chimiques. Ceux-ci sont essentiels aux hauts rendements des cultures mais par contre, ils sont susceptibles aux pertes par lessivage et par ruissellement vers les nappes phréatiques et les eaux de surface (Taiz et Zeiger, 2002; Easton et Petrovic, 2004). L'efficacité des fertilisants dépend de plusieurs facteurs, notamment des propriétés du sol et de la topographie qui varient spatialement dans un champ (Atherton et al. 1999). Pour réduire la pollution ainsi que les coûts reliés aux fertilisants, il convient de développer des méthodes de gestion localisée des champs, tenant compte de leur hétérogénéité spatiale. Une telle gestion requiert des outils de diagnostic fournissant des données spatiales fiables et peu coûteuses, qui guideront les applications de fertilisants *in situ* selon les besoins des cultures en un point précis du champ. Ces outils doivent être efficaces et rapides, i.e. capables d'estimer en temps réel les besoins nutritionnels des cultures.

Pour répondre à ces exigences, les méthodes optiques semblent plus appropriées que les traditionnelles analyses chimiques des tissus végétaux, qui sont longues, onéreuses et destructrices. Les propriétés de réflectance et de fluorescence des plantes, déterminées par leur structure et leurs composantes (pigments, métabolites secondaires...), sont des signatures optiques pouvant indiquer l'état physiologique et les besoins nutritionnels des cultures. Plusieurs études ont démontré le potentiel de la réflectance à détecter les carences minérales (Penuelas et Filella, 1998; Adams et al. 2000). La réflectance est

largement utilisée pour mesurer la couverture du sol par la végétation, les contenus en pigments photosynthétiques (Penuelas et Filella, 1998; Samson et al. 2000) et en eau. Elle peut même être utilisée à grande échelle, par avion ou satellite. Malgré ses avantages, les changements de réflectance dus aux pertes de chlorophylles ne permettent pas de discriminer les stress subis par les plantes (comme des différentes carences minérales) et ne donnent qu'un diagnostic tardif de l'état physiologique des végétaux (Buschmann et Lichtenthaler, 1998).

Récemment, la fluorescence des végétaux est apparue comme un outil optique prometteur pour estimer leur état physiologique, plus particulièrement pour la détection des carences minérales (Heisel et al. 1996; Buschmann et Lichtenthaler, 1998). L'absorption de radiations UV par des feuilles vertes induit l'émission de deux types de fluorescences distinctes mais hautement complémentaires: la fluorescence bleu-vert (FBV) émise entre 400 et 600 nm, principalement par des composés phénoliques, et la fluorescence chlorophyllienne (FChl), émise entre 650 et 800 nm uniquement par la chlorophylle-a (F690 et F740) (Figure 1.1).



**FIGURE 1.1 : Spectre typique de la fluorescence émise par une feuille de dicotylédone excitée par UV (tiré de Buschmann et Lichtenthaler, 1998).**

Les caractéristiques spectrales et les intensités relatives de ces deux fluorescences sont déterminées par les composantes et les propriétés internes des feuilles, qui elles dépendent de l'état physiologique des végétaux et de leur réponse aux facteurs environnementaux (Cerovic et al. 1999). Misant sur le potentiel de cet outil, des prototypes de fluorimètres sont déjà testés au champ pour estimer les besoins nutritionnels des cultures (Belzile et al. 2003; Goulas et al. 2004).

Cependant, l'examen de la littérature récente indique que l'application de la fluorescence au champ est peut-être prématurée, les progrès technologiques devançant notre compréhension des processus physiologiques affectant les émissions de fluorescences. Premièrement, la capacité de la fluorescence à détecter précocement les inhibitions de croissance causées par les carences minérales n'a pas été clairement démontrée. Il est en effet surprenant de constater que parmi toutes les études suggérant le potentiel de la fluorescence des végétaux à détecter les carences, rares sont celles ayant comparé les variations de fluorescence aux diminutions de croissance (McMurtrey et al. 1994; Corp et al. 2003; Mercure et al. 2004). Deuxièmement, la capacité des fluorescences induites par UV à discriminer les principales carences minérales n'a pas encore été établie. Certaines études ont observé des effets distincts des carences sur les émissions des fluorescences, mais les degrés d'inhibition de croissance n'étaient pas présentés (Chappelle et al. 1984; Heisel et al. 1996). Par contre, les changements de fluorescence induits par une carence d'un même élément peuvent varier selon les études. Par exemple, les variations de la FBV sont différentes, voire opposées, chez des plants carencés en azote (revu par Cerovic et al. 1999). Finalement, l'utilisation des fluorescences induites par UV pour la détection des carences demeure plutôt empirique, ne reposant pas encore sur une base physiologique cohérente. Une étude systématique est donc nécessaire pour améliorer notre compréhension des facteurs qui détermineront le succès de la fluorescence à détecter efficacement les carences minérales.

## 1.2 Objectifs

Tel que décrit auparavant, les carences en N, P et K présentent des symptômes caractéristiques : effets marqués sur les vieilles feuilles, changement de la pigmentation, apparition de nécroses, etc. Ces symptômes visuels permettent donc une détection et une discrimination des carences, mais de façon assez tardive. Par ailleurs, les carences minérales affectent l'émission de fluorescence (section 1.5.3), qui varie selon la concentration en composés phénoliques et en chlorophylles. L'analyse de la variation de la fluorescence est donc un outil prometteur dans la détection et la discrimination précoce des carences minérales. Pourtant, bien que le potentiel de la fluorescence induite par UV à détecter les carences a fait l'objet de plusieurs études, il n'a pas été encore été pleinement exploité. En effet, l'examen de littérature montre que son application au champ ne peut être fiable tant que certains points n'auront pas été démontrés. Dans ce contexte, les objectifs de cette maîtrise sont:

1. Déterminer la capacité de la fluorescence induite par UV à discriminer les carences en N, P, K chez des plants de tournesol démontrant des inhibitions similaires de croissance. Le même degré d'inhibition des plants carencés (50% par rapport aux plants contrôle) permet pour la première fois de comparer les carences N, P et K sur une même base.
2. Déterminer la position dans le plant (feuilles âgées *versus* feuilles jeunes) où les effets des carences sur la fluorescence sont les plus prononcés.
3. Évaluer la précocité de la fluorescence à détecter les différentes carences par rapport à l'inhibition de croissance et à l'apparition de symptômes visuels.
4. Fournir une base physiologique supportant la détection des carences minérales par la fluorescence, en établissant une relation de cause à effet depuis les inhibitions de croissance jusqu'aux variations de fluorescence

## CHAPITRE 2

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### **2.1 La fluorescence chlorophyllienne (FChl)**

La fluorescence chlorophyllienne (FChl) est largement utilisée dans les différents domaines de la biologie végétale, tels que la physiologie, l'agronomie, la foresterie. L'analyse de la FChl permet d'obtenir de précieuses informations concernant l'efficacité photosynthétique des végétaux, renseignant sur leur état physiologique et leur réponse aux facteurs environnementaux.

Les différentes informations pouvant être fournies par la FChl dépendent bien sûr de la méthode d'analyse utilisée. La méthode qui est de loin la plus répandue est celle dite des « flashes saturants ». Cette méthode, qui repose sur une solide base théorique et de nombreuses évidences expérimentales, renseigne sur le fonctionnement immédiat de l'appareil photosynthétique, soit sur l'efficacité des réactions photochimiques de la photosynthèse et des mécanismes de dissipation thermique de l'énergie lumineuse absorbée (Kraus et Weis, 1991; Govindjee 1995; Maxwell et Johnson, 2000). Une autre approche analytique de la FChl, dont le potentiel n'est pas encore pleinement exploité et qui sera testée dans la présente étude, est celle de l'analyse spectrale de la FChl. Plutôt que de miser sur les variations rapides de la FChl associées à l'état fonctionnel de l'appareil photosynthétique, l'analyse spectrale de la FChl émise par une feuille informe plutôt sur ses propriétés structurelles telles que les concentrations en chlorophylles et composés phénoliques, les caractéristiques de l'épiderme et du type de mésophylle.

Suite à l'absorption de radiations UV et/ou de lumière visible par des molécules de chlorophylle-a, une fraction ( $\leq 5\%$ ) de l'énergie d'excitation des molécules de chlorophylle-a sera dissipée sous forme de fluorescences rouge

(FR) et rouge lointain (FRL), avec des pics d'émission situés entre 685 et 690 nm et entre 735 et 740 nm (Figure 1.1). Selon les études, les pics d'émission de la fluorescence chlorophyllienne sont dénotés F685 ou F690, et F735 ou F740. Dans mon étude, F685 et F735 seront utilisés pour mentionner ces pics. Chez les plantes ayant un métabolisme photosynthétique de type C3 telles que le tournesol, environ 70% de la fluorescence détectée provient du photosystème II, un des deux complexes protéiques présents dans les thylacoïdes des chloroplastes responsables des réactions photochimiques de la photosynthèse. Chez les plantes de type C4 telles que le maïs, cette proportion peut atteindre 50% à cause de leur anatomie particulière dite de « Kranz » (Pfündel et al. 1999). Il est à noter que la FR provient exclusivement du photosystème II tandis que les deux types de photosystèmes (I et II) participent à l'émission de la FRL (Briantais et al. 1986).

La proportion des photosystèmes I et II est relativement constante et n'est donc pas responsable des variations des intensités relatives des deux pics caractéristiques de la fluorescence chlorophyllienne induite par UV ( $F\text{Chl}_{\text{UV}}$ ) (FR et FRL). Ces intensités relatives sont influencées par la concentration en chlorophylles, la longueur d'onde d'excitation, le coté de la feuille excité ainsi que de la proportion de l'énergie absorbée par les chlorophylles qui est dissipée sous forme de chaleur dans les antennes du photosystème II (atténuation ou quenching non-photochimique affectant davantage le photosystème II que le photosystème I) (Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999). Dans cette étude, seulement les variations de concentrations de chlorophylles affecteront les intensités relatives des FR et FRL. Cet aspect sera discuté en détails à la section 2.3.1 (Ratio FR/FRL).

## 2.2 La fluorescence bleu-vert (FBV)

L'excitation d'une feuille par une radiation UV induit en plus de la FChl, l'émission d'un autre type de fluorescence, la FBV. Cette dernière se caractérise

par un pic d'émission situé près de 440 nm (F440) dans la région bleue et d'un épaulement près de 520 nm (F520) dans la région verte du spectre électromagnétique (Figure 1.1). Contrairement à la FChl, la FBV ne varie pas rapidement (dans l'ordre des secondes ou des minutes) selon les variations de l'activité photosynthétique ou autre processus physiologique. Par contre, son interprétation se complique par le fait que plusieurs molécules présentes dans les feuilles peuvent émettre de la FBV.

Chez des feuilles intactes, il a été démontré que la FBV détectée émane principalement de l'acide férulique estérifié aux parois des cellules de l'épiderme (Cerovic et al. 1996; Lichtenthaler et Schweiger, 1998). L'acide férulique est un produit du métabolisme secondaire, plus précisément un composé phénolique de la classe des acides hydroxycinnamiques. Il est à noter que l'accumulation de l'acide férulique contribue à la rigidification des parois des cellules épidermiques (Fry, 1986), d'où une diminution de la croissance cellulaire et foliaire (Cosgrove, 1997). Aussi, la concentration d'acide férulique est généralement plus élevée chez les espèces de monocotylédones, expliquant ainsi pourquoi les intensités de FBV détectées chez ces espèces sont supérieures à celles détectées chez les espèces de dicotylédones (Buschmann et Lichtenthaler, 1998).

D'autres composés importants dans la feuille peuvent aussi contribuer à l'émission de la FBV (Cerovic et al. 1999). C'est le cas du NADPH, du FAD et de la plupart des protéines, dont la Rubisco (la protéine la plus abondante dans les feuilles et impliquée dans la fixation photosynthétique du carbone). Cependant, il a été estimé que ces composés ne contribuent qu'à près de 5% de la FBV détectée chez des feuilles intactes puisque, dû à leur localisation dans les cellules du mésophylle, leur fluorescence est fortement réabsorbée par les pigments photosynthétiques (les chlorophylles et les caroténoïdes). Toutefois, chez certaines espèces comme le pois (*Pisum sativum*), la contribution du mésophylle à la FBV détectée à partir d'une feuille entière peut

atteindre 40% (Cerovic et al. 1999). Ces observations suggèrent que, par rapport à la FBV totale détectée à partir d'une feuille entière, la proportion de la FBV provenant des cellules du mésophylle (acide férulique, NADPH, FAD...) varie de façon inverse avec la concentration des pigments photosynthétiques.

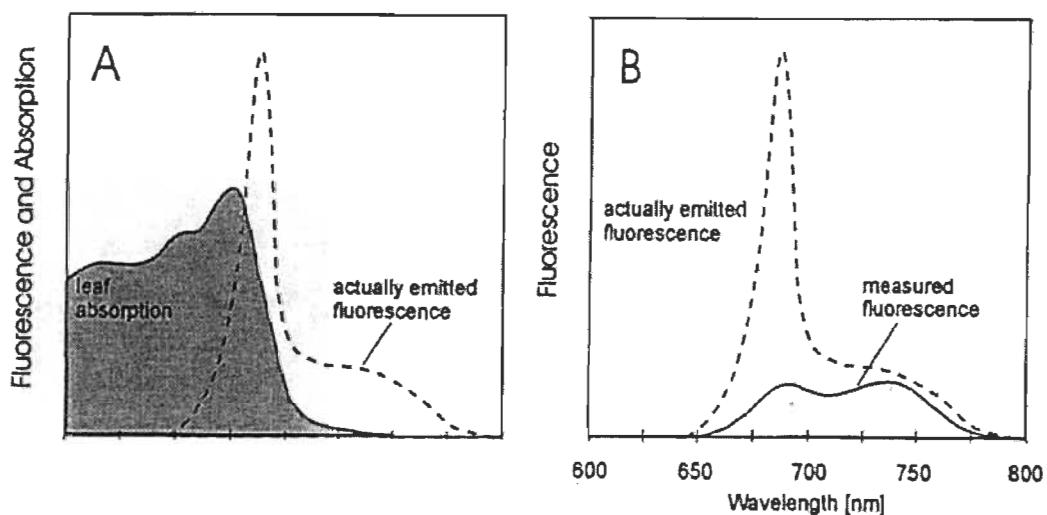
En plus de composés phénoliques liés aux parois cellulaires, d'autres composés phénoliques (principalement des flavonoïdes) sont présents sous forme soluble dans les vacuoles des cellules épidermiques. Ces composés, quoique non-fluorescents, absorbent fortement les rayons UV, diminuant ainsi leur pénétration à travers l'épiderme des feuilles et par conséquent l'excitation des molécules de chlorophylles.

### 2.3 Les ratios de fluorescence

Les intensités absolues de fluorescence dépendent des paramètres externes et méthodologiques souvent incontrôlables, tels que la distance, la position des feuilles affectant l'angle d'excitation et de détection, la qualité des filtres utilisés, la sensibilité des détecteurs (Cerovic et al. 1999; Heisel et al. 1996). Pour minimiser ces variations, les ratios des intensités des principaux pics de fluorescence sont souvent utilisés. Les ratios utilisés pour notre étude sont : FR/FRL ( $F_685/F_735$ ), FBV/  $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  et  $F\text{Chl}_{\text{UV}}/F\text{Chl}_{\text{BL}}$ . Ils permettent de mieux caractériser les variations spectrales de la fluorescence causées par les facteurs physiologiques et environnementaux. Cependant, ces ratios entraînent une certaine perte d'information (variations du dénominateur et/ou du numérateur) (Cerovic et al. 1999). Par exemple, la variation du ratio FBV/  $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  peut être due soit à la variation de la FBV (causée par l'accumulation de composés phénoliques), soit à la variation de la  $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  (pouvant être affectée par une diminution de la concentration en chlorophylles ou par l'accumulation de composés phénoliques absorbants l'UV dans l'épiderme), soit à la variation de la FBV et de la  $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  à la fois.

### 2.3.1 Le ratio FR/FRL (F685/F735)

Tel que mentionné à la section 2.1, les intensités relatives des deux pics de FChl à 685 nm et 735 nm dépendent de plusieurs facteurs dont le plus important et le plus pertinent dans cette étude est la concentration de chlorophylles dans les feuilles. Cette influence des chlorophylles s'explique par le chevauchement existant entre leur spectre d'absorption et leur spectre d'émission de fluorescence (Figure 2.1).

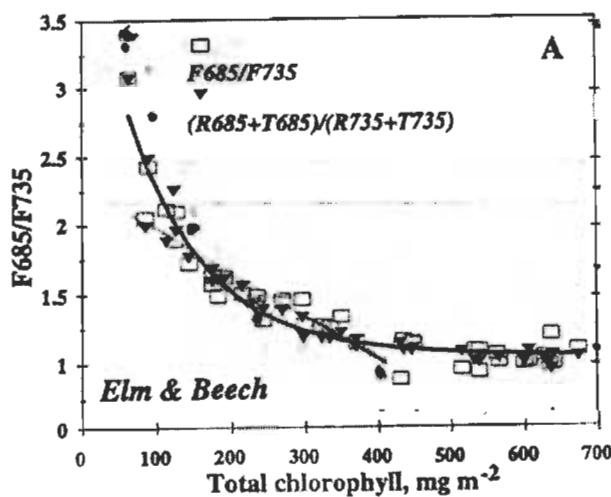


**FIGURE 2.1 : Chevauchement entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission de fluorescence de la chlorophylle dans les feuilles, responsable de la ré-absorption préférentielle de la fluorescence rouge par rapport à la fluorescence rouge lointain (A). Le spectre de la fluorescence chlorophyllienne mesuré est donc la différence entre la fluorescence réellement émise et la fluorescence absorbée par les chlorophylles (B) (Tiré de Buschmann et Lichtenhaller, 1998).**

Un tel chevauchement est causé par le déplacement de la position du maximum d'émission de fluorescence vers des longueurs d'onde supérieures par rapport à la position du maximum d'absorption. Ce phénomène, observable chez la plupart des fluorophores, s'appelle le déplacement de Stokes. Il s'explique par le fait que lorsqu'une molécule (chlorophylle) absorbe un photon, elle passe à un état électronique excité. Avant de se désexciter, cette molécule

perd un peu d'énergie sous forme de vibration ou de chaleur. La molécule retourne ensuite à son état électronique initial en émettant un photon d'énergie inférieure ( $E$ ) au photon absorbé car il y a eu une perte d'énergie (en vibration ou chaleur). Sa longueur d'onde  $\lambda$  est par conséquent plus longue (plus rouge) selon l'équation  $E = h/\lambda$ . où  $h$  est la constante de Planck.

Le chevauchement entre l'absorption et l'émission est plus important dans le rouge que dans le rouge lointain (Figure 2.1). Par conséquent, la fluorescence rouge (F685) est réabsorbée plus fortement par la chlorophylle que la fluorescence rouge lointain (F735). Cela implique aussi que plus la concentration en chlorophylles est élevée, plus la F685 sera réabsorbée par rapport à la F735. Donc une augmentation de la concentration en chlorophylles entraîne une hausse du ratio F685/ F735. En fait, il existe une relation curvilinéaire inverse entre le ratio F685/F735 et la concentration en chlorophylles dans les feuilles (Gitelson et al. 1998) (Figure 2.2).



**FIGURE 2.2:** Relation curvilinéaire inverse entre le ratio F685/F735 et la concentration en chlorophylles dans des feuilles de hêtre et de bouleau (Adapté de Gitelson et al. 1998)

La plus forte réabsorption de la FR par rapport à la FRL permet d'expliquer les différences entre les ratios F685/F735 mesurés sur une même feuille mais des côtés adaxial (supérieur) et abaxial (inférieur). En effet, la plus forte densité de cellules dans le mésophylle palissadique du côté adaxial des feuilles favorise la ré-absorption de la fluorescence rouge émise, et donc diminue le ratio F685/F735 (Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999).

### 2.3.2 Le ratio FBV/FChl<sub>UV</sub>

Le ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> est largement utilisé dans la littérature parce qu'il est particulièrement sensible aux stress environnementaux. Cette grande sensibilité s'explique par les origines distinctes de la FBV et de la FChl<sub>UV</sub> : la FBV émane principalement de l'acide férulique présent dans l'épiderme et la FChl<sub>UV</sub> est émise par la chlorophylle dans le mésophylle. Souvent, les stress environnementaux affectent de façon opposée (voir section 2.6.2) les concentrations de composés phénoliques et de chlorophylles, et par conséquent les intensités des FBV et FChl.

La grande sensibilité du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub> à plusieurs stress environnementaux implique cependant que l'interprétation de ce ratio est difficile. Par exemple, une augmentation du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub> peut être causée par A) l'accumulation des composés phénoliques fluorescents (acide férulique) responsable d'une plus grande émission de la FBV; B) l'accumulation des composés phénoliques non-fluorescents (flavonoïdes) solubles dans les vacuoles des cellules épidermiques. Ces composés absorbent fortement les rayons UV dans l'épiderme, diminuent l'excitation des chlorophylles dans le mésophylle et donc diminue l'émission de la FChl<sub>UV</sub> (hausse de FBV/ FChl<sub>UV</sub>); C) une baisse de la concentration en chlorophylles entraîne *i)* une diminution de la FChl, et *ii)*, chez les espèces où le mésophylle contribue significativement à la FBV détectée, une baisse de la concentration de chlorophylles diminuera la

réabsorption de la FBV, d'où une augmentation de la FBV et donc du ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> (Lichtenthaler et Miehé, 1997). Donc le FBV/ FChl<sub>UV</sub> est un indicateur sensible des stress environnementaux mais à lui seul, a un faible potentiel en tant qu'outil diagnostic pour identifier le stress impliqué.

### 2.3.3 L'absorbance UV de l'épiderme (LogFER)

La déplétion de la couche d'ozone stratosphérique observée depuis plusieurs années suscite un grand intérêt pour la compréhension de l'acclimatation des plantes aux rayons UV, et plus particulièrement pour la capacité de l'épiderme des feuilles à bloquer les UV. Cet effet protecteur est assuré en grande partie par les composés phénoliques solubles dans les vacuoles des cellules épidermiques (Bilger et al. 1997). Ces composés, principalement de la classe des flavonoïdes, forment un écran protecteur dans l'épiderme et empêchent la pénétration des rayons UV vers le mésophylle sous-jacent où ils peuvent causer des dommages cellulaires (notamment l'inhibition de la photosynthèse et de la croissance cellulaire). Ainsi, il a été démontré que par rapport à des feuilles de plantes d'intérieur, celles des plantes d'extérieur naturellement exposées à des radiations UV possèdent une plus grande concentration en composés phénoliques et une plus faible absorbance UV de l'épiderme (Buschmann et Lichtenthaler, 1998). En conséquence, l'acclimatation des feuilles aux UVs naturels du soleil entraîne une diminution de l'intensité de la FChl induite par une excitation UV.

Pendant longtemps, l'absorbance UV de l'épiderme était estimée par des mesures d'absorbance UV d'extraits bruts des composés phénoliques des feuilles (Kolb et Pfundel, 2005). En 1997, Bilger et al. ont introduit une méthode rapide et fiable pour mesure la « transmittance-UV de l'épiderme (TEUV) » (le pourcentage de rayons UV transmis par rapport aux rayons incidents) basée sur le ratio des intensités de FChl induite par UV et par lumière bleue. Cette

méthode repose sur le principe que la lumière bleue n'est pas absorbée au niveau de l'épiderme, contrairement aux rayons UV. La FChl induite par lumière bleue ( $FChl_{BL}$ ) peut donc servir de référence. De façon alternative, le paramètre  $\log(FChl_{BL}/FChl_{UV})$  (LogFER pour Fluorescence Excitation Ratio) est utilisé dans des études plus récentes afin d'estimer l'absorbance UV de l'épiderme (Ounis et al. 2001; Goulas et al. 2004; Cartelat et al. 2005).

Il est important de noter qu'en plus des radiations UV, d'autres facteurs environnementaux telles que les carences azotées peuvent causer une accumulation des composés phénoliques dans l'épiderme qui n'ont pas de fonction de photoprotection. En général, une carence en azote entraîne une accumulation de composés phénoliques d'où une augmentation de l'absorbance UV de l'épiderme et donc une baisse de l'intensité de la  $FChl_{UV}$  (Mercure et al. 2004; Cartelat et al. 2005). Une corrélation linéaire ( $R^2=0.93$ ) entre le ratio  $FChl_{UV}/FChl_{BL}$  (transmittance de l'épiderme) et la concentration foliaire en azote a ainsi été observée chez des plants de maïs cultivés à différentes doses d'azote (Samson et al. 2000). Une base physiologique pouvant expliquer l'influence de facteurs environnementaux tels que la carence en azote sur l'absorbance UV de l'épiderme sera présentée à la section 2.6.2. Considérant l'importance de l'absorbance UV de l'épiderme dans la protection des végétaux contre les radiations UV ainsi que dans l'estimation des besoins en azote des cultures, des appareils portatifs permettant de mesurer en un point précis (5 mm diam.) de la feuille l'absorbance UV de l'épiderme sont maintenant commercialisés, le UV-A-PAM (Walz, Allemagne) et le DUALEX (Force-A, France) (Goulas et al. 2004; Pfündel et al. 2007).

## 2.4 L'imagerie de fluorescence

Tel que mentionné précédemment, les méthodes le plus couramment utilisées pour évaluer l'intensité de la fluorescence consistent à prendre les

mesures en un point précis de la feuille. Cependant, ces mesures ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité spatiale de la fluorescence au niveau de la feuille entière. Par exemple, la FBV émane principalement des nervures (tissus dépourvus de chlorophylles), alors que la FChl est surtout émise au niveau des zones entre les nervures (Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999). Chez les graminées, la surface occupée par les nervures augmente lors d'une carence en azote (Lambers et al. 1998), ce qui contribue aux intensités élevées de FBV mesurées chez des feuilles de monocotylédones telles le maïs (Heisel et al. 1996). De plus, la surface occupée par des tissus de soutien (sclérenchyme) augmente avec le stade de développement chez des feuilles de graminées, (section 2.5.1), ce qui explique en partie la plus forte intensité dans les zones plus âgées à la base des feuilles de monocotylédones, et donc le gradient d'intensité de FBV, maximale à la base de ces feuilles puis diminuant vers l'apex (Meyer et al. 2003). En plus des caractéristiques anatomiques, l'hétérogénéité spatiale de la fluorescence des feuilles peut être causée par des facteurs externes comme par exemple, la diffusion d'un herbicide ou la propagation d'un pathogène dans la feuille.

Ces informations illustrent bien l'importance de tenir compte de l'hétérogénéité spatiale de la fluorescence au niveau de la feuille entière. Ceci est possible grâce à l'imagerie de fluorescence, qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence pour chacun des centaines de milliers de pixels décrivant une seule feuille. L'imagerie de fluorescence est une méthode prometteuse, permettant de détecter et d'analyser la distribution des intensités de fluorescence au niveau de la feuille entière (Langsdorf et al. 2000). Cette technique présente l'avantage de comprendre si les variations de fluorescence sont associées à un patron de distribution spécifique à l'échelle de la feuille. Aussi, elle augmente sensiblement la précision statistique des mesures. En effet, il est possible de représenter les intensités de chacun des pixels sous forme d'histogramme, et ainsi mieux évaluer la distribution des intensités et même identifier des populations distinctes d'intensités (Buschmann et al. 2000;

Langsdorf et al. 2000). Il est aussi possible de visualiser la distribution spatiale des ratios de fluorescence en divisant les valeurs des pixels de deux images de fluorescence. Par exemple, l'image du ratio F685/F735 permet de visualiser des différences spatiales de la concentration en chlorophylles.

Malgré ses avantages évidents, l'imagerie de fluorescence n'est pas encore complètement exploitée. À notre connaissance, il n'existe aucune image du paramètre logFER ( $\log [FChl_{BL} / FChl_{UV}]$ ), qui nécessite une double excitation (bleue et UV) de la FChl. Pourtant, ce paramètre permet de mesurer l'absorbance UV de l'épiderme, qui est sensible aux carences azotées. C'est pourquoi l'imagerie représente un grand intérêt dans l'analyse et la compréhension de la relation entre la variation de fluorescence et l'accumulation des composés phénoliques, notamment lors de carences minérales.

## **2.5 Facteurs physiologiques et environnementaux faisant varier les émissions de fluorescence**

Les intensités relatives des FChl et FBV sont déterminées par les composantes et les propriétés internes des feuilles, qui elles sont influencées par le stade de développement des végétaux, leur état physiologique et les facteurs environnementaux. Il est donc important de discuter de quelques-uns de ces facteurs.

### **2.5.1 Le stade de développement**

Les concentrations de composés phénoliques et de chlorophylles sont des caractéristiques variant durant le développement des feuilles et donc pouvant modifier les émissions de fluorescence. Les changements de fluorescence avec le stade de développement ont surtout été étudiés pour des feuilles de

graminées (monocotylédones) (Heisel et al. 1996; Meyer et al. 2003; Wagner et al. 2003). Chez ces espèces, la zone méristématique (division cellulaire) se situe à la base des feuilles. En se déplaçant de la base vers l'apex, les cellules croissent et se différencient, créant un gradient longitudinal de développement au niveau de la feuille même (Meyer et al. 2003). Des travaux ont montré que la FChl<sub>UV</sub> varie selon ce gradient longitudinal des feuilles : de la base vers l'apex, la FChl<sub>UV</sub> diminue malgré la hausse de la quantité de chlorophylles (Meyer et al. 2003; Wagner et al. 2003). Cette diminution de la FChl<sub>UV</sub> ne peut donc pas être expliquée par une baisse de la quantité de chlorophylle, mais plutôt par une accumulation le long des feuilles de composés phénoliques (les flavonoïdes) dans l'épiderme absorbants les rayons UV, diminuant donc leur pénétration dans la feuille (Meyer et al. 2003; Wagner et al. 2003). L'accumulation des flavonoïdes durant la croissance des feuilles avait déjà été notée chez des céréales (Knogge et Weissenböck, 1986). Cette baisse de la FChl avec l'âge des cellules peut expliquer l'augmentation du ratio FBV/FChl observée chez des feuilles âgées par rapport à de jeunes feuilles chez le maïs (Heisel et al. 1996).

Quant à la FBV, elle diminue de la base à l'apex chez des feuilles de blé (Meyer et al. 2003). Cette variation de la FBV le long des feuilles est reliée à la formation de larges bandes de sclérenchyme à la base des feuilles. Les parois des cellules de ce tissu de soutien sont riches en composés phénoliques fluorescents (acide férulique). La largeur de ces bandes de sclérenchyme à la base des feuilles augmente à mesure que la feuille vieillit (Meyer et al. 2003). Ainsi, de la base à l'apex des feuilles, la surface des bandes de sclérenchyme par unité de surface diminue, d'où une baisse de la FBV le long des feuilles (de la base vers l'apex). Par contre, plus la feuille est âgée, plus il y a de tissu de soutien, et plus l'intensité de la FBV sera élevée.

À notre connaissance, il n'existe pas d'études montrant les variations des FBV et FChl en fonction du développement chez des feuilles de dicotylédones (telles celles du tournesol). Contrairement aux monocotylédones, la croissance

des feuilles des dicotylédones est diffuse, et il n'existe donc pas de gradient de développement longitudinal. De plus, le tissu de soutien chez ces feuilles est le collenchyme (riche en pectine) plutôt que le sclérenchyme (Raven et al. 2000). On peut cependant supposer la présence d'un gradient de développement dans le temps sur la base de l'hypothèse de la Balance Croissance-Différentiation (Lambers et al. 1998). Selon cette hypothèse, le carbone est investi dans les nouveaux tissus chez les feuilles en croissance. Une fois la croissance terminée et le début de la différentiation cellulaire, ces dernières allouent une plus grande part du carbone vers la synthèse de métabolites secondaires (composés phénoliques). Puisque les composés phénoliques affectent l'émission de fluorescence, cette hypothèse permettrait donc d'expliquer la variation des composés phénoliques et donc de la fluorescence en fonction de l'âge.

### **2.5.2 Les principaux facteurs de stress environnementaux**

Avant d'interpréter les effets des facteurs de stress sur les émissions de fluorescence par une plante, il est d'abord important de distinguer entre les facteurs de stress et les réponses des plantes aux stress. Lorsqu'une plante subit des conditions défavorables à sa croissance, à son développement et à son succès reproducteur (globalement, à son 'fitness') mais pas nécessairement létales, plusieurs mécanismes d'acclimatation sont mis en action pour parer à cette situation de stress. Ces réponses peuvent être spécifiques ou non (Larcher, 2003). Une réponse peut être spécifique à un facteur de stress particulier, comme par exemple la synthèse de phytochélatines chez les espèces métallophytes (tolérantes aux métaux lourds) (Schat et al. 2002). Par contre, plusieurs facteurs de stress peuvent induire des réponses similaires, telles les accumulations d'anti-oxydants, de composés phénoliques, de polyamines, etc. (Larcher, 2003). Il convient de noter l'aspect dynamique de ces réponses qui évoluent dans le temps. Ces réponses aux facteurs de stress,

notamment l'accumulation de composés phénoliques, sont reliées à la variation d'émission des fluorescences induites par UV.

La relation entre la réponse des végétaux aux facteurs de stress et la variation de fluorescence a été rapportée dans plusieurs études. Cependant, l'absence de paramètres physiologiques (croissance, photosynthèse, composés phénoliques) complique l'interprétation des changements de fluorescence. Le tableau 2.1 résume les effets de quelques facteurs de stress sur les ratios de fluorescence. Ce tableau démontre que différents facteurs de stress peuvent avoir des effets similaires sur un même ratio. Cependant, l'utilisation de plusieurs ratios de fluorescence pourrait permettre la discrimination de ces facteurs.

**TABLEAU 2.1 : Effets de différents facteurs de stress sur les ratios de fluorescence FBV/F685, FBV /F735 et F685/F735**

Conditions de croissance	Ratios de fluorescence		
	FBV/F685	FBV/F735	F685/F735
Température élevée	↑↑*	↑↑	=
Stress hydrique	↓↓	↓↓	↑↑
Attaque par des mites	↓↓	↓↓	=
Radiations UV	↓↓	↓↓	↑
Carence en N	↑↑	↑↑	↑

\*↓↓ : forte diminution; ↓ : diminution; ↑↑ : forte augmentation; ↑ : augmentation du ratio; = : pas de changement significatif; (adapté de Buschmann et Lichtenhaller, 1998).

### 2.5.3 Les variations de fluorescence en réponse aux carences minérales

Parmi les nombreux facteurs de stress modifiant l'émission de fluorescence, les carences minérales ont fait l'objet d'une attention particulière. En effet, les variations des fluorescences induites par UV en réponse aux

carcéances minérales ont été rapportées dans plusieurs études, plus particulièrement lors de carences en azote (Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Chappelle et al. 1984; Corp et al. 1997; Mercure et al. 2004). Les plantes présentant une carence en azote montrent généralement une augmentation du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub> avant l'augmentation du ratio F685/F735, soit avant qu'il y ait une perte en chlorophylle dans les feuilles. La hausse du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub> serait donc due à l'accumulation des flavonoïdes dans l'épiderme, absorbant dans l'UV (Cerovic et al. 1999). Dans le cas de carence sévère en azote causant des baisses importantes de la concentration en chlorophylles, l'importance de la réabsorption de la FBV diminue, entraînant par conséquent des augmentations de l'intensité de la FBV et du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub>.

Les études portant sur la fluorodétection des autres types de carences sont plus rares. Chez des plants de maïs carencés en potassium, le ratio FBV/FChl diminue fortement par rapport au contrôle (Chappelle et al. 1984). Lors d'une carence en potassium, la FChl est augmentée alors que la FBV n'est pas altérée, ce qui suggère que cette carence diminue l'absorbance UV de l'épiderme par les flavonoïdes (diminution de l'effet d'écran UV). Par contre, les études sur les effets des carences en fer sur la fluorescence ne sont pas constantes. Certains résultats ont montré une augmentation du ratio FBV/FChl suite à une carence en fer (Chappelle et al. 1984) mais une diminution de ce ratio dans d'autres cas (Heisel et al. 1996). Il reste cependant difficile de comparer les différents résultats obtenus jusqu'à présent, car l'inhibition de croissance des plantes n'était pas précisée. Or, il est important d'avoir un degré d'inhibition similaire de croissance pour pouvoir comparer différentes carences minérales. Pour pouvoir interpréter les effets distincts des carences minérales sur la fluorescence induite par UV, les paramètres physiologiques tels que la photosynthèse, la croissance, les composés phénoliques, les pigments photosynthétiques devraient être mesurés. Ces paramètres permettraient de mieux comprendre de quelle façon les ratios de fluorescence varient, et si une augmentation du ratio FBV/ FChl<sub>UV</sub> par exemple serait due a) à l'accumulation

de composés phénoliques fluorescents (acide férulique) b) à l'accumulation de flavonoïdes absorbant le rayonnement UV dans l'épiderme ou plutôt c) à une perte du contenu en chlorophylle dans la feuille (Cerovic et al. 1999).

## 2.6 Aspect physiologique des composés phénoliques

### 2.6.1 Rôle de protection contre les stress biotiques et abiotiques

Tel que vu précédemment (section 2.5.3), il existe une relation entre les facteurs de stress environnementaux, l'accumulation des composés phénoliques et les variations de fluorescence induite par UV. Il est donc important d'examiner les modèles physiologiques expliquant les variations phénotypiques de la concentration des composés phénoliques en réponse au stress.

Les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques constituent des métabolites secondaires (Taiz et Zeiger, 2002). Comme leur nom l'indique, ces métabolites étaient précédemment considérés comme secondaires dans le métabolisme de la plante, et même comme des déchets métaboliques. Cependant, leur importance est de plus en plus reconnue en écophysiolologie, plus particulièrement dans les interactions biotiques. Par exemple, une classe de composés phénoliques, les anthocyanines, sont responsables de la couleur de la plupart des fleurs et des fruits, qui permet l'attraction des pollinisateurs et des herbivores responsables de la dispersion des graines. Les métabolites secondaires ont également une importance dans les réponses aux facteurs de stress biotiques. Leur accumulation peut causer une barrière physique contre les pathogènes et herbivores ou augmenter l'astringence des feuilles, ce qui contribue à diminuer les dommages par les herbivores.

De plus, l'exposition aux rayons UV du soleil peut causer l'accumulation de certains composés phénoliques dans l'épiderme des feuilles. Tel que discuté

à la section 2.3.3, cette accumulation protège le mésophylle et peut influencer la fluorescence émise par les feuilles de deux manières. Premièrement, une augmentation des composés phénoliques insolubles (acides hydroxycinnamiques estérifiés aux parois cellulaires) entraîne une augmentation de l'intensité de la FBV. Ensuite, les composés phénoliques solubles (flavonoïdes) dans l'épiderme forment un « écran » protecteur qui diminue l'absorbance UV, d'où une baisse de l'excitation UV des molécules de chlorophylle dans le mésophylle et donc une baisse de l'intensité de la FChl<sub>UV</sub> (section 2.3.3). Enfin, le fait que les composés phénoliques s'accumulent sous l'effet de plusieurs types de stress oxydatifs tels les métaux lourds, l'ozone, le froid, ... suggère que ces composés, dont les capacités anti-oxydantes sont bien connues, auraient un rôle protecteur possible contre les radicaux libres générés lors de stress oxydatifs (Dixon et Paiva, 1995).

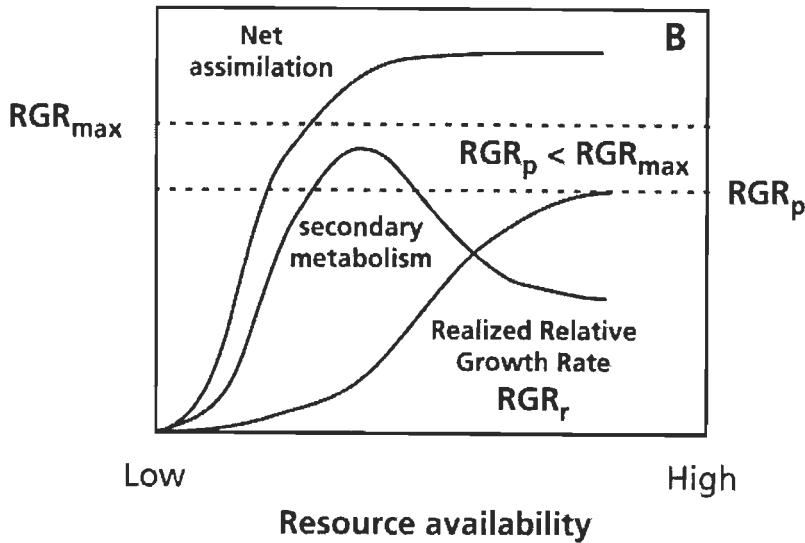
### **2.6.2 Modèle physiologique expliquant la variation des composés phénoliques lors de carences minérales**

Les accumulations de composés phénoliques chez les plantes soumises aux stress oxydatifs et aux UVs représentent une réponse directe des plantes (e.g. induction de gènes ciblés, activation d'enzymes impliqués dans le métabolisme secondaire, ...) visant à les protéger contre ces stress. Chez les plantes carencées en azote, les accumulations de composés phénoliques seraient constitueraient plutôt une réponse passive, s'expliquant par un désordre physiologique fréquent chez les végétaux, soit le déséquilibre de la relation source/puits. Chez une plante, les organes « source » sont les feuilles matures, capables de synthétiser les sucres nécessaires à la croissance de la plante. Les organes « puits » sont ceux qui doivent importer les sucres produits par la photosynthèse afin d'assurer leur développement (les jeunes feuilles en expansion, les graines, les fruits). Les sucres sont exportés de la source vers le puits via le phloème (Marschner, 2002). Le déchargement des sucres du

phloème vers les puits est relié à l'activité métabolique et au taux de croissance du puits. Lors de nombreux stress environnementaux (carences, stress hydrique, hypoxie, métaux lourds), la division et la croissance cellulaires sont plus ralenties que la photosynthèse (Sinclair et Vadez, 2002). La plus faible demande des organes puits en hydrates de carbone causera leur accumulation dans les organes sources. La diversion de métabolites primaires tels le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate vers les voies métaboliques secondaires (voie de l'acide shikimique, voie de l'acide malonique) résultera en l'accumulation de composés phénoliques (Taiz et Zeiger, 2002; Wink, 1999).

L'hypothèse de la Balance Carbone/Nutriments (CNB) est un cas particulier du déséquilibre source/puits et s'applique bien à la compréhension de la variation des composés phénoliques lors de carences minérales. En effet, l'accumulation de composés phénoliques lors de carences en azote (Northup et al. 1995; Waring et al. 1985; Mercure et al. 2004) est consistante avec cette hypothèse (CNB) qui est largement acceptée en écophysiologie (Lambers et al. 1998). Selon cette hypothèse, sous des conditions optimales, les plantes allouent préférentiellement le carbone à leur croissance. En cas de carences minérales telles en azote et en phosphore (Sinclair et Vadez, 2002), la croissance est ralentie avant la photosynthèse. Ce déséquilibre entre la croissance et la photosynthèse résulte en l'accumulation d'hydrates de carbone qui favoriseront le métabolisme secondaire (figure 2.3). Selon l'hypothèse CNB, une carence modérée cause une augmentation de la concentration des composés phénoliques. Par contre, dans le cas d'une carence sévère, leur concentration diminue.

Puisque les composés phénoliques renseignent sur l'état physiologique des plantes, ils peuvent servir de « sonde » indiquant précocement la présence de stress. En se basant sur le CNB, on peut donc prédire que la fluorescence induite par UV, sensible à la concentration en composés phénoliques, peut s'avérer être un outil utile dans la détection des carences minérales des plantes.



**FIGURE 2.3 : Modèle montrant le taux de croissance relatif ( $RGR_r$ ), le taux net d'assimilations, et la production de métabolites secondaires.(Tiré de Lambers et al. 1998)**

## 2.7 Rôles physiologiques des éléments N, P et K

Puisque les éléments minéraux ont des fonctions spécifiques dans les plantes, leur carence peut se manifester par des symptômes visuels particuliers pouvant être précédés d'une variation de fluorescence. L'analyse de la fluorescence, affectée par la concentration en composés phénoliques et en chlorophylles, pourrait donc aider à détecter précocement les carences minérales.

### 2.7.1 L'azote (N)

L'azote (N) est l'élément minéral requis en plus grande quantité par la plante (Taiz et Zeiger, 2002). Il est un constituant des acides aminés, des

protéines, des acides nucléiques, de la chlorophylle (Taiz et Zeiger, 2002; Jones, 1998). L'azote est un élément mobile dans la plante, pouvant être remobilisé des vieilles feuilles vers les plus jeunes. Lors d'une carence en N, la croissance est rapidement inhibée, les composés phénoliques augmentent puis les concentrations en protéines et en chlorophylles diminuent (tel que prédit par l'hypothèse CNB). Des chloroses se forment de façon généralisée sur la feuille (surtout chez les vieilles feuilles) et les tiges des plants carencés en N sont rachitiques, et souvent rigidifiés. Les symptômes sont d'abord visibles chez les plus vieilles feuilles (organes source), où est stocké l'azote pour le transport vers les zones en croissance. Ceci suggère que la détection des carences peut être plus précoce chez les vieilles feuilles que chez les jeunes feuilles.

### **2.7.2 Le phosphore (P)**

Le phosphore (P) appartient au groupe d'éléments minéraux importants pour le stockage d'énergie et dans le maintien de la structure des plantes. Dans la plante il est sous forme  $\text{PO}_4^{3-}$  (phosphate), dans les tiges principales, les pétioles des feuilles et les zones en croissance active. Il est un composant des acides nucléiques, des phospholipides et dans les molécules énergétiques telles l'ATP et le NADPH (Taiz et Zeiger, 2002; Jones, 1998).

Une plante présentant une carence en P a une croissance ralentie, et contrairement à la carence en N, les feuilles deviennent vert foncé avec des zones de tissu mort (« spots » nécrotiques). Les feuilles matures présentent une pigmentation pourpre due à l'accumulation d'anthocyanines (qui sont des flavonoides colorés généralement responsables de l'attraction des polliniseurs). Comme pour l'azote, les symptômes sont d'abord visibles chez les feuilles les plus âgées (Jones, 1998).

### 2.7.3 Le Potassium (K)

Contrairement à l'azote et au phosphore, le potassium (K) est un élément minéral présent dans la plante sous forme d'ion libre ( $K^+$ ) et a un rôle dans la régulation du potentiel osmotique. Il est donc impliqué dans les mécanismes de pression de turgescence et permet de maintenir le statut hydrique des cellules (Taiz et Zeiger, 2002; Jones, 1998).

Une carence en K entraîne une baisse de la qualité et de la quantité des fruits et une plus grande sensibilité des plantes aux infections. Les symptômes sont d'abord visibles chez les vieilles feuilles, qui présentent d'abord un enroulement puis des nécroses à leur pointes et sur leurs marges (Taiz et Zeiger, 2002; Jones, 1998).

# CHAPITRE 3

## DÉTECTION ET DISCRIMINATION DES CARENCES EN N, P ET EN K CHEZ LE TOURNESOL *Helianthus annuus* PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCES

### 3.1 Introduction

Le potentiel des FBV et FChl à détecter les carences minérales chez les végétaux, principalement la carence en azote a été démontré dans la revue de littérature présentée au chapitre 2 (McMurthey et al. 1994; Heisel et al. 1996; Langdorff et al. 2000; Corp et al. 2003). Par rapport à des plants contrôles, les plants carencés en N montrent généralement une baisse de la FChl<sub>UV</sub>, attribuable à l'accumulation de composés phénoliques dans l'épiderme des feuilles diminuant la TEUV de l'épiderme (Mercure et al. 2004). Contrairement à la carence en N, les observations rapportées dans la littérature sur les variations de fluorescences causées par les autres carences ne sont pas aussi bien définies, et parfois même contradictoires. Ceci pourrait résulter des différences marquées entre les études quant à la sévérité des carences, des espèces utilisées, de l'âge des feuilles utilisées (Heisel et al. 1996) ainsi que de l'hétérogénéité spatiale de la fluorescence au niveau des feuilles.

Récemment, l'introduction de l'imagerie de fluorescence a ouvert une nouvelle dimension dans la détection et la discrimination des carences minérales chez les végétaux (Langdorf et al. 2000; Corp et al. 2003). Comparée à la fluorescence mesurée en un point restreint sur la feuille, l'analyse de la fluorescence sur la feuille entière permet de détecter des variations spatiales de fluorescence au niveau de la feuille entière et améliore la précision statistique. Cependant, le potentiel de l'imagerie de fluorescence n'a pas encore été pleinement exploité, puisqu'aucune étude n'a présenté jusqu'à ce jour des images de ratio de fluorescences induites par excitation UV et par excitation bleue, permettant de visualiser la TEUV de l'épiderme et donc la distribution des

composés phénoliques qui s'y accumulent lors de carences en N (Mercure et al. 2004).

Dans cette étude, un nouveau système d'imagerie de fluorescence des végétaux a été utilisé pour déterminer le potentiel des FBV et FChl à non seulement détecter mais aussi discriminer les carences en N, P et en K chez des plants de tournesol *Helianthus annuus*. Les plants utilisés montraient les mêmes degrés de carences, i.e. la même inhibition de croissance par rapport à des plants contrôles, afin de faciliter la compréhension des variations de fluorescence observées.

## 3.2 Matériel et Méthodes

### 3.2.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Les expériences ont été réalisées sur des plants de tournesol nains (*Helianthus annuus*, cultivar SunSpot vb). Des graines étaient semées dans des bacs de vermiculite placés dans une chambre de croissance sous une photopériode de 16h/8h, à des températures de 23°/18°C, et à une humidité relative de 70%. La lumière était fournie par des lampes à haute pression au sodium (HPS) d'une intensité de 250-300 µmoles photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à la hauteur des plants. Après 15 jours de croissance, les plants étaient transférés individuellement en milieu hydroponique. Chaque plant était alors disposé dans un contenant de 1 L rempli de solution nutritive de Hoagland (Taiz et Zeiger, 2002). Dans chaque contenant, l'aération des racines était assurée par une pompe à air (ELITE 800) dont le débit d'air était de 400 mL min<sup>-1</sup> environ. L'acclimatation des plants aux conditions de culture hydroponique s'est fait pendant une semaine avant le début des expériences.

Pour induire les carences en N, P et en K, la solution Hoagland a été modifiée. Pour la carence en azote, les concentrations en KNO<sub>3</sub>, le Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, et

le  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ont été diminuées en remplaçant ces sels par du KCl,  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , de façon à diminuer que la concentration finale en azote (préservant le ratio  $\text{KNO}_3/\text{NH}_4$ ) et donc maintenir les mêmes concentrations pour les autres éléments. Pour la carence en phosphore, le  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a été remplacé par du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Enfin, pour la carence en potassium, le  $\text{NaNO}_3$  a été utilisé au lieu du  $\text{KNO}_3$ . Puisque l'ajout des différents sels lors de la modification de la solution Hoagland fait varier la concentration en NaCl dans le milieu, des tests ont donc été réalisés pour savoir si l'ajout de NaCl avait une incidence sur la croissance des plantes. Du NaCl était ajouté à des plants contrôle, et il s'est avéré que le NaCl n'a aucun effet notable sur le développement des plantes.

### **3.2.2 Dispositif expérimental**

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les concentrations en N, P et K causant une inhibition de croissance d'environ 50% par rapport aux plants contrôle (les plants contrôle étaient ceux qui ont reçu de la solution nutritive de Hoagland complète). Les concentrations 15%N, 0%P et de 0%K par rapport à la solution Hoagland complète ont ainsi été trouvées sur la base de la surface de la 4<sup>ème</sup> feuille (comptée à partir du bas de la plante), soit celle s'étant complètement développée durant les traitements.

Après la semaine d'acclimatation en milieu liquide, les plants étaient aléatoirement divisées en quatre groupes : un groupe de plants contrôle (solution Hoagland complète) et trois autres avec la solution Hoagland où la concentration d'un seul élément (N, P ou K) était modifiée pour obtenir la carence minérale désirée, soit 50% de la surface de la 4<sup>ème</sup> feuille. Le protocole expérimental comptait 10 répétitions pour chaque traitement, soit 40 plants au total (10 contrôle, 10 plants carencés en N, 10 plants carencés en P, 10 plants carencés en K) et l'expérience a été répétée deux fois. Les solutions des bouteilles contenant chacune un plant étaient changées régulièrement durant

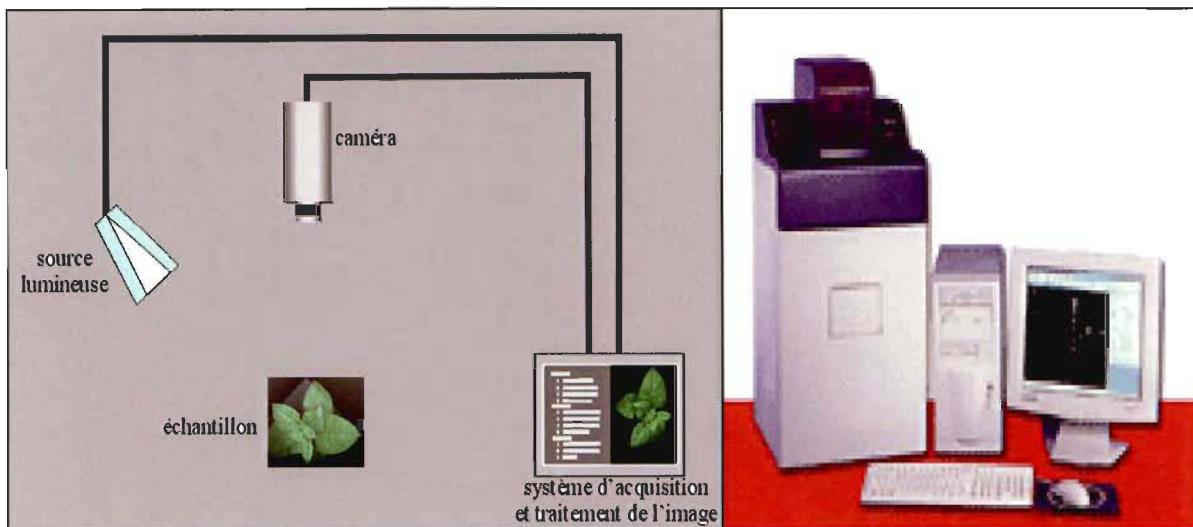
les expériences afin d'éviter la formation de micro algues sur les parois. Après 15 jours de traitement en milieu hydroponique, les différentes mesures de surface foliaire et de fluorescence étaient prises sur les feuilles 2 et 4 (ces chiffres correspondent à leur ordre d'apparition sur le plant). Les feuilles 2, plus âgées, étaient matures et pleinement développées avant le début des traitements tandis que les feuilles 4, se sont presque entièrement développées pendant les traitements.

### **3.2.3 Mesures de surface foliaire**

Les mesures de surface des feuilles 2 et 4 ont été réalisées à partir des images de fluorescence des feuilles (section 3.2.4), enregistrées en présence d'une longueur étalon au niveau des feuilles. Les surfaces foliaires étaient ensuite calculées à l'aide du logiciel SigmaScan (SPSS, IL USA).

### **3.2.4 Mesures de fluorescences**

Les intensités de fluorescence étaient mesurées grâce à un système modifié d'imagerie de fluorescence AutoChemi (UVP, Upland, CA, USA), qui consiste de trois composantes principales : l'excitation lumineuse, la détection de la fluorescence (caméra) et l'acquisition de l'image (Figure 3.1). L'excitation bleue a été obtenue par le filtre bleu fourni par UVP tandis que pour l'excitation UV, nous avons placé les filtres UG11 et BG40 devant la lampe UV afin de bloquer la lumière visible résiduelle venant de la lampe. La FBV a été détectée en plaçant le filtre bleu SWP 610 (Melles Griot, USA) devant la caméra CCD monochrome 12 bits (4096 teintes) de haute performance (Hamamatsu ORCA-ER). La FChl a été détectée grâce au filtre passe-haut RG695 placé devant la caméra, tandis que filtres interférentiels (demi-largeur de bande de 10 nm) ont été utilisés pour mesurer les intensités de F685 et F695.



**FIGURE 3.1 : Système d'imagerie utilisé pour mesurer les intensités de fluorescence au niveau de la feuille entière** (adapté de Lenk et al. 2007)

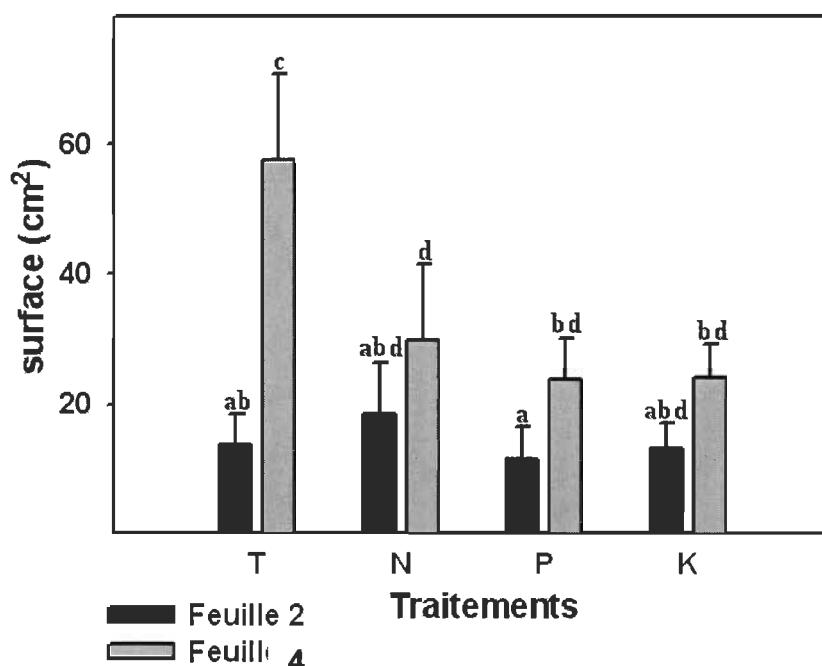
Les feuilles étaient disposées dans la chambre noire, et un plateau en acrylique était placé sur la feuille afin de les aplatiser pour éviter les reliefs. Puis les images de fluorescence étaient successivement enregistrées pendant une exposition de 3 minutes pour les excitations UV et bleue. Pour corriger l'hétérogénéité spatiale des excitations UV et bleue, des images sans feuille de tournesol ont été enregistrées en présence d'une feuille de papier (émettant une fluorescence bleue induite par UV) et en présence du filtre Roscolux « Urban Blue ». Ces images de fluorescence ainsi que celles mesurées en absence d'excitation (dark background) ont permis de corriger les images de fluorescence des feuilles de tournesol selon l'hétérogénéité spatiale des excitations grâce au logiciel fourni par l'UVP.

Une fois l'image corrigée obtenue, l'intensité moyenne des fluorescences pour chaque feuille était mesurée par le logiciel SigmaScanPro. Finalement, le logiciel ImageJ (National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) a été utilisé pour effectuer les ratios d'images de fluorescence et pour représenter les images d'intensités de fluorescence selon une échelle de fausses couleurs. Il

est à noter que notre système d'imagerie est le premier à pouvoir mesurer la TEUV de l'épiderme sur la feuille entière, grâce à la double excitation UV et bleue. Cette TEUV est calculée par le ratio de  $F\text{Chl}_{\text{UV}}/F\text{Chl}_{\text{BL}}$ , i.e. les intensités des FChl induites par excitation UV et par excitation bleue (Bilger et al. 1997).

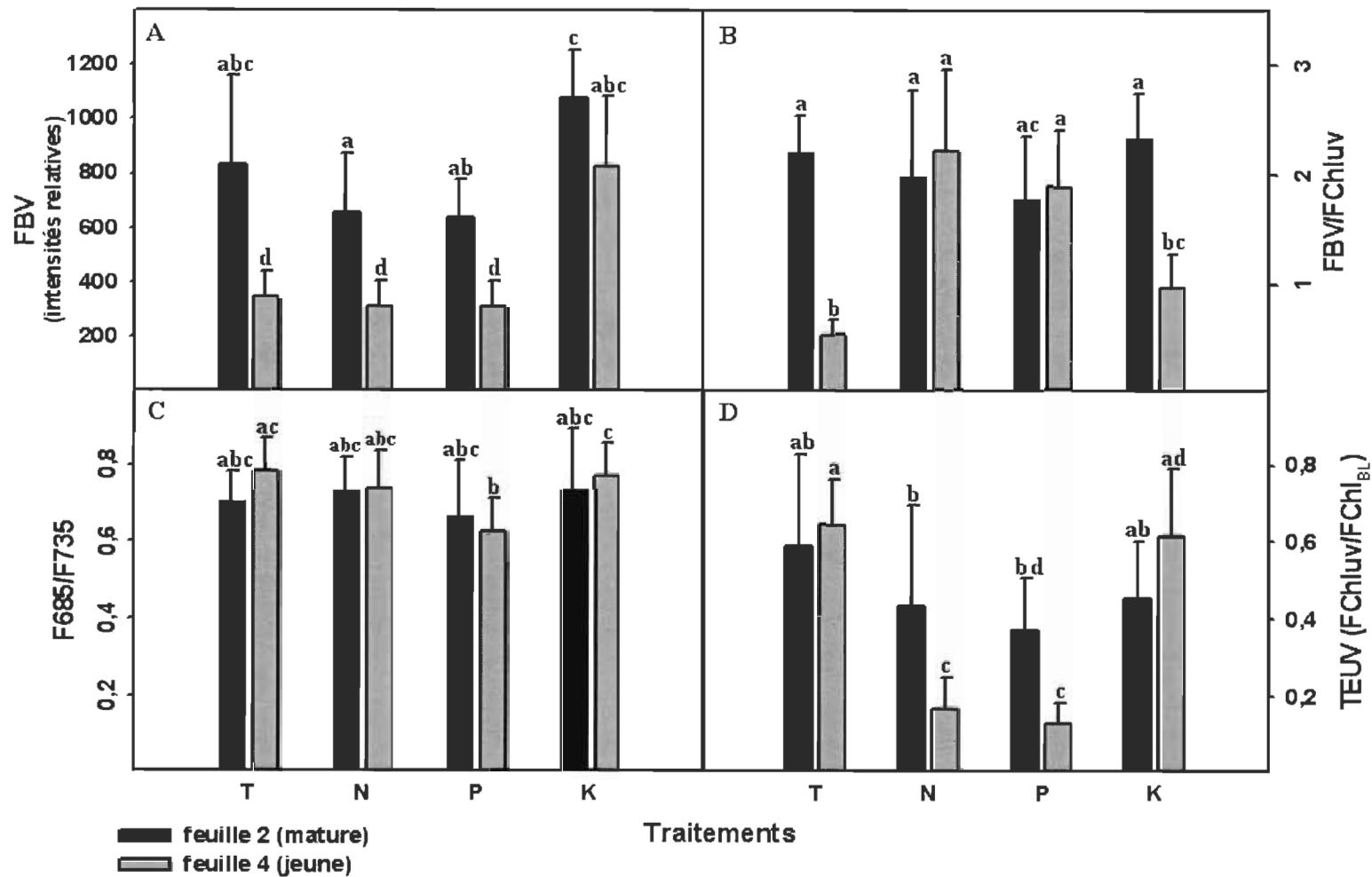
### 3.3 Résultats

La figure 3.2 compare les surfaces des feuilles 2 et 4 des plants contrôles et des plants carencés (15%N, 0%P et 0%K) après 15 jours de traitements. Les surfaces des feuilles 2 (feuilles matures) étaient similaires chez les plants contrôles et carencés. Par contre, les surfaces des feuilles 4 (jeunes feuilles) des plants carencés en N, P et K correspondaient à 51%, 41% et 42% respectivement de celles des feuilles 4 des plants contrôle. Les différences entre les surfaces des feuilles carencées et contrôles sont significatives mais non pas celles entre les plants carencés.



**FIGURE 3.2 : Surfaces des feuilles 2 (feuille mature) et des feuilles 4 (jeune feuille) des plants contrôles et carencés en N, P et K.**

Cela permet donc de comparer sur une même base les effets des différentes carences sur les émissions des FBV et FChl. Les paramètres de fluorescence sont présentés à la figure 3.3 : A) l'intensité de la FBV, B), le ratio FBV/FChl<sub>UV</sub>, C), F685/F735 et D), la transmittance UV de l'épiderme (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>). Tout d'abord pour la feuille 2 (mature), il n'y a aucun effet significatif des carences sur l'intensité de la FBV et sur les 3 ratios de fluorescence. Par contre, pour les jeunes feuilles (feuilles 4), on peut observer que, par rapport aux plants contrôles, les feuilles des plants carencés en K se distinguent des autres feuilles par une augmentation significative de l'intensité de la FBV ( $p<0.01$ ), celle-ci demeurant inchangée pour les plants carencés en N et P. De plus, en comparant les ratios FBV/FChl<sub>UV</sub>, on observe que chez les plants carencés en K, le ratio n'est pas significativement différent des plants contrôles. Par contre, le ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> augmente significativement ( $p<0.01$ ) chez les feuilles des plants carencés en N et P. Puisque chez les feuilles carencées en N et P les intensités de la FBV étaient inchangées tandis que les ratios FBV/FChl<sub>UV</sub> augmentaient, cela implique des diminutions de l'intensité de FChl<sub>UV</sub> chez ces feuilles. Cela est consistant avec les fortes baisses de la transmittance UV de l'épiderme (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>) observées que chez les feuilles carencées en N et P. Cela indique une plus grande concentration de composés phénoliques solubles et absorbants l'UV dans l'épiderme des plants carencés en N et P. Enfin, le ratio F685/735 permet de distinguer les feuilles des plants carencés en P, qui sont les seules à montrer une baisse significative de ce ratio. Puisqu'il existe une relation curvilinéaire inverse entre le ratio F685/F735 et la concentration en chlorophylles (Gitelson et al. 1998), la baisse du ratio F685/735 chez les plants carencés en P peut donc être expliquée par une plus grande concentration en chlorophylles, symptôme caractéristique de cette carence (Taiz et Zeiger, 2002).

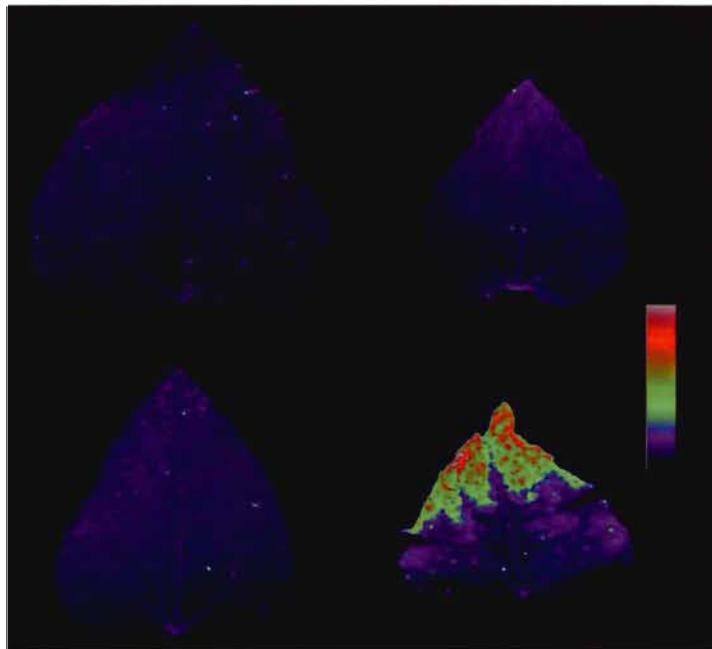


**FIGURE 3.3 : Paramètres de fluorescence des plants contrôles (T) et des plants carencés (N, P et K).**

**A) FBV ; B) FBV/FChl<sub>UV</sub> ; C) F685/F735 ; D) TEUV (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>)**

La différence significative entre les traitements est illustrée par la différence entre les lettres ou groupes de lettres.

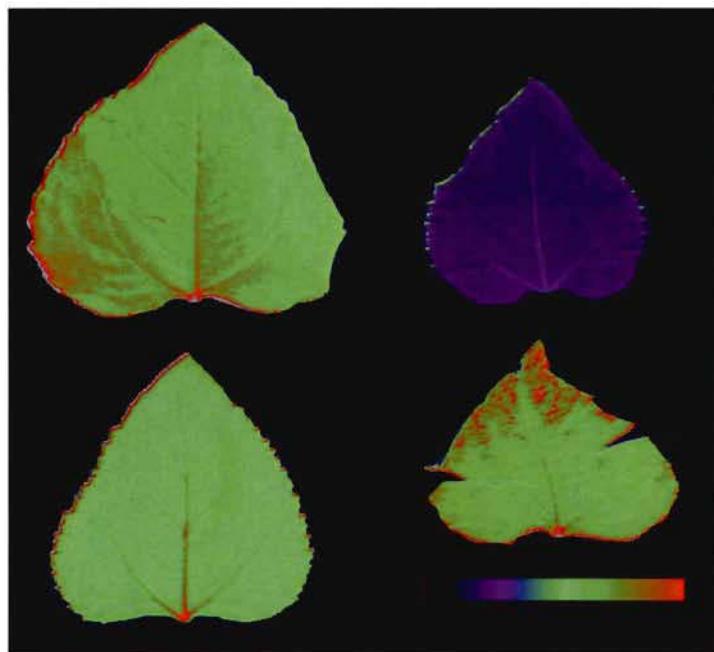
Les figures 3.4, 3.5 et 3.6 présentent les images de fluorescence de feuilles représentatives des différents traitements. Ces images permettent de voir à l'échelle de la feuille entière les effets des carences minérales sur les paramètres de fluorescence présentés dans la figure 3.3, et ainsi de mieux les comprendre. Tout d'abord, on remarque que l'augmentation de l'intensité de la FBV chez les plants carencés en K est clairement localisée à l'apex des feuilles (figure 3.4). Les différences d'intensités de fluorescence entre l'apex et le reste de la feuille sont près de deux ordres de grandeur. À cause de la grande échelle de fausses couleurs qui a dû être utilisée, les intensités de FBV sur les autres feuilles apparaissent relativement homogènes.



**FIGURE 3.4 : Images de la FBV émise par des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K. Les intensités de fluorescence sont présentées en fausses couleurs, tel que montré sur l'échelle (unités arbitraires).**

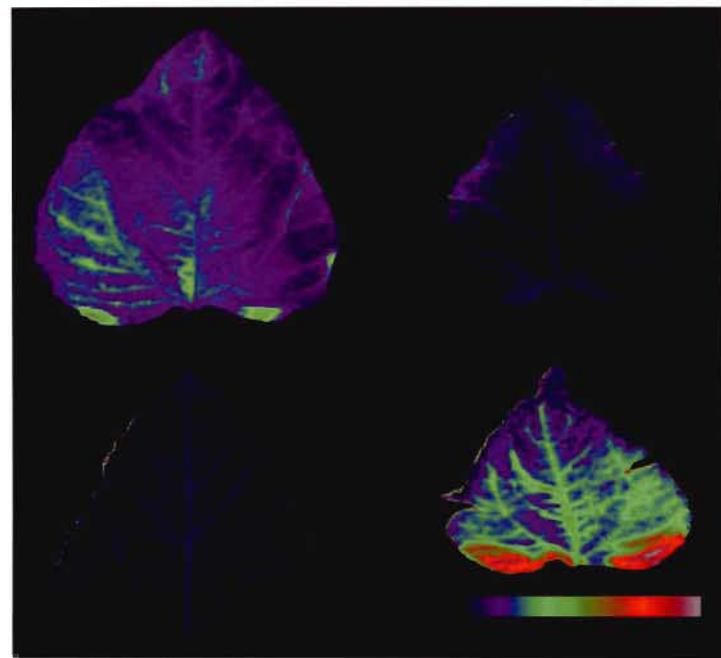
La distribution des intensités du ratio F685/F735, qui est inversement relié à la concentration en chlorophylles (Gitelson et al. 1998) est montrée à la figure

3.5 pour les 4 types de feuilles. Tout d'abord, il apparaît évident que les valeurs de ce ratio sont nettement plus faibles chez la feuille carencée en P, quoique relativement homogène. Une exception notable cependant est celle de la feuille carencée en K, où les valeurs du ratio F685/F735 sont nettement plus élevées à l'apex, et ce, selon le même patron de distribution observé pour la FBV chez cette feuille (figure 3.4).



**FIGURE 3.5 : Images du ratio FR/FRL des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K.** Le ratio FR/FRL augmente du violet au rouge, tel que montré sur l'échelle (**unités arbitraires**).

Quant aux images de TEUV de l'épiderme ( $F\text{Chl}_{\text{UV}}/F\text{Chl}_{\text{BL}}$ ) (Figure 3.6), les valeurs sont nettement plus faibles mais plutôt homogènes chez les feuilles des plants carencés en N et P. Chez la feuille carencée en K, la transmittance UV de l'épiderme est particulièrement hétérogène et supérieure (surtout à sa base) par rapport à celle de la feuille contrôle. Cependant, la hausse de la TEUV de l'épiderme chez cette feuille n'était pas représentative de l'ensemble des feuilles carencées en K.



**FIGURE 3.6 :** Images du ratio  $F\text{Chl}_{\text{UV}}/F\text{Chl}_{\text{BL}}$  (transmittance UV de l'épiderme) des feuilles de plants de tournesol contrôle et carencés en N, P et K. Le ratio  $F\text{BV}/F\text{Chl}_{\text{UV}}$  augmente du violet au rouge, tel que montré sur l'échelle.

### 3.4 Discussion

Dans cette étude, des carences en N, P et K ont été induites chez des plants de tournesol causant une inhibition similaire de croissance, soit environ 50% de la croissance de la feuille 4 développée presqu'entièrement durant les traitements. Les mesures de FBV et FChl effectuées sur ces plants non seulement confirment le potentiel de la fluorescence à détecter les carences en N, P et K, tel que rapporté par plusieurs études (McMurtrey et al. 1994; Corp et al. 2003; Mercure et al. 2004), mais démontrent pour la première fois la possibilité de discriminer ces trois types de carence.

Tout d'abord, les variations de fluorescence observées chez nos plants carencés en azote sont cohérentes avec celles rapportées dans la littérature, soit une augmentation du ratio  $FBV/FChl_{UV}$  accompagnée par une baisse de la TEUV de l'épiderme. Ces variations suggèrent une accumulation dans l'épiderme de composés phénoliques absorbant l'UV chez les plants carencés en azote (Cerovic et al. 1999; Mercure et al. 2004). Contrairement à la plupart des études antérieures, les plants carencés en N dans notre étude ne montraient pas d'augmentation du ratio  $F685/F735$ . Puisque ce ratio est inversement corrélé à la concentration en chlorophylles (Gitelson et al. 1998), ceci indique que la carence en N imposée dans notre étude était faible à modérée, ne causant pas de baisses notables de la concentration en chlorophylles. Il est bien accepté que lors de l'induction d'une carence azotée, la croissance est inhibée avant la photosynthèse (Sinclair et Vadez, 2002), suivie par la perte de chlorophylles. Par conséquent, la fluorodétection de la carence en N est plus précoce que les detections basées sur les symptômes visuels (chlorose) ou sur les changements de réflectance (causés par une perte de chlorophylles) (Penuelas et Filella, 1998).

La carence en P a des effets similaires à la carence en N (hausse du ratio  $FBV/FChl_{UV}$  et diminution de la TEUV de l'épiderme), mais se distingue par une

baisse significative du ratio F685/F735. Une baisse de ce ratio indique une hausse de la concentration foliaire en chlorophylles (Gitelson et al. 1998). Une telle hausse est un symptôme caractéristique des feuilles chez les plants carencés en P (Taiz et Zeiger, 2002). À notre connaissance, il existe une seule étude rapportant les effets d'une carence en phosphore sur l'émission de la fluorescence induite par UV. Chappelle et al. (1984) ont observé chez le maïs carencé en P une baisse significative de la  $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  ainsi qu'une baisse, quoique non significative, du ratio F690/F440 (donc l'inverse de notre ratio FBV/ $F\text{Chl}_{\text{UV}}$ ). Il est possible que la hausse de la concentration en chlorophylles dans les feuilles carencées en phosphore cause une réabsorption plus importante de la FBV (Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999), contribuant à diminuer le ratio FBV/ $F\text{Chl}_{\text{UV}}$ . Donc, l'azote et le phosphore ont des effets semblables sur le ratio FBV/ $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  et la transmittance UV de l'épiderme. La hausse du ratio FBV/ $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  serait probablement moins importante chez les plants carencés en P qu'en N, à cause de la plus grande réabsorption de la FBV par les chlorophylles. Toutefois, des carences en N et en P se distinguent par leurs effets opposés sur le ratio F685/F735.

Les effets de la carence en K sont clairement distincts de ceux des carences en N et en P sur les variations de fluorescence. Les feuilles carencées en K sont les seules à montrer des augmentations des intensités de la FBV par rapport à celles des feuilles non-carencées (Fig. 3.3A). Contrairement aux carences en N et en P, celle en K ne causait pas de variations du ratio FBV/ $F\text{Chl}_{\text{UV}}$  et de la TEUV de l'épiderme (Fig. 3.3B-D).

L'analyse de la distribution spatiale de la fluorescence par imagerie permet de révéler l'origine de la hausse de la FBV chez les feuilles carencées en K. En effet, la comparaison des figures 3.4 et 3.5 montre que la hausse de la FBV à l'apex des feuilles chez les plants carencés en K coïncide fortement avec une augmentation des valeurs du ratio F685/F735. La hausse de ce ratio correspond à une baisse de la concentration en chlorophylles à l'apex (Gitelson et al. 1998).

La forte similarité des patrons de distribution des intensités de FBV et du ratio F685/F735 implique que la hausse de l'intensité de la FBV à l'apex des feuilles résulte de sa plus faible réabsorption suite à la perte de chlorophylles. Une étude de Tardieu et al. (1999) a montré que chez des feuilles de tournesol, l'expansion des cellules cesse tout d'abord à l'apex puis plus tardivement à la base de la feuille. Quoique moins prononcé que chez les feuilles de monocotylédones, il existe un gradient de développement chez des feuilles de dicotylédones telles que le tournesol, les cellules de l'apex étant donc plus âgées. Elles sont donc plus susceptibles d'entrer en sénescence plus rapidement que les cellules à la base de la feuille, d'où leur diminution précoce en chlorophylles, avant même l'apparition des symptômes typiques de la carence en potassium, soit un enroulement puis des nécroses à leur pointes et sur leurs marges (Taiz et Zeiger, 2002 ; Jones, 1998). L'imagerie de fluorescence permet donc de distinguer et de localiser les effets des carences minérales sur les variations de fluorescence, ce qui n'aurait pas été possible si la fluorescence avait été mesurée en un seul point de la feuille. L'imagerie de fluorescence contribue donc à améliorer la capacité de détection et de discrimination des carences.

Il est à noter que les effets de la carence en K sur les émissions de fluorescence observés les feuilles de tournesol sont différents de ceux observés chez les feuilles de maïs par Chappelle et al. (1984). Ces auteurs ont en effet observé une baisse de la FBV et une hausse de la FChl<sub>UV</sub> (et donc une hausse du ratio F690/F440). Cela indique que les effets de la carence en K sur les émissions de fluorescence peuvent varier fortement selon des facteurs tels que l'espèce et le degré de sévérité de la carence (non indiqué dans l'étude de Chappelle et al. 1984).

Enfin, les résultats de notre étude montrent que les effets des carences étaient plus prononcés chez les jeunes feuilles (feuille 4) que chez les feuilles matures (feuille 2). Pourtant, puisque l'azote, le phosphore et le potassium sont

des éléments remobilisés des feuilles matures vers les jeunes feuilles, les feuilles matures montrent davantage les symptômes visuels typiques des carences en azote, phosphore et potassium que les jeunes feuilles. Nos résultats montrant des variations significatives de fluorescence chez les jeunes feuilles peuvent être expliqués par le fait que lors de notre étude, les feuilles matures étaient déjà pleinement développées avant que le traitement ne commence. Les jeunes feuilles par contre, étaient en pleine expansion et ont donc subi les carences minérales tout au long de leur développement. Il faut mentionner que les variations de fluorescence induites par les carences minérales semblent être détectables plus précocement que les symptômes visuels.

Le tableau 3.1 ci-dessous résume les effets des carences en N, P et K, sur les émissions de fluorescence et sur les ratios de fluorescence.

**TABLEAU 3.1 : Effets des carences minérales N, P et K sur l'intensité et la distribution des intensités et des ratios de fluorescence.**

		Paramètres de fluorescence				
		Intensité de la FBV	Intensité de la FChl <sub>UV</sub>	FBV/FChl <sub>UV</sub>	TEUV (FChl <sub>UV</sub> /FChl <sub>BL</sub> )	F685/F735
Effets des carences	Azote (N)	=	--	++	--	=
	Phosphore (P)	=	--	+	-	-
	Potassium (K)*	++	+	=	+	+

Les intensités de fluorescence et les ratios des plants carencés en N, P et K sont comparés aux plants contrôle - : diminution ; -- : diminution significative ; + : augmentation ; ++ : augmentation significative ; = : inchangé

\* : L'augmentation de la FBV, du ratio F685/F735 sont localisées à l'apex des feuilles. La TEUV est supérieure surtout à la base des feuilles.

## CHAPITRE 4

# PRECOCITE DE DETECTION DES CARENCES MINERALES PAR LA FLUORESCENCE ET BASE PHYSIOLOGIQUE SUPPORTANT LES VARIATIONS DE FLUORESCENCE

### 4.1 Introduction

Le potentiel de la fluorescence induite par UV à détecter les carences minérales chez les végétaux est supporté par de nombreuses études (revues par Cerovic et al. 1999; voir aussi Langdorf et al. 2000; Corp et al. 2003). Les résultats du chapitre précédent non seulement supportent ce potentiel à détecter les carences mais aussi démontrent pour la première fois la capacité de la fluorescence à les discriminer, du moins à distinguer entre les carences en N, K et P chez le tournesol. Le présent chapitre porte sur deux aspects importants de la fluorodétection des carences minérales, qui ont pourtant été peu ou pas étudiés jusqu'à maintenant. Premièrement, il est surprenant de constater que la précocité de la fluorescence à détecter les différentes carences par rapport à l'inhibition de croissance et à l'apparition de symptômes visuels n'a pas encore été évaluée. Aussi, afin d'éviter l'utilisation de la fluorodétection de façon empirique, il est important de définir une base physiologique capable de supporter la fluorodétection des carences minérales, en établissant une relation de cause à effet depuis les inhibitions de croissance jusqu'aux variations de fluorescence.

Parmi les études réalisées jusqu'à présent sur la fluorodétection des carences minérales, rares sont celles qui comparent les variations des paramètres de fluorescence induite par UV aux inhibitions de croissance. Dans ces rares études, les comparaisons sont faites à la fin d'une période de traitement prolongée. Ceci ne permet donc pas de vérifier si les variations de fluorescence induite par UV apparaissent précocement lors des carences ou seulement après des inhibitions marquées de croissance. Pourtant, chez des

plants de maïs cultivés en présence de différentes doses de N, des mesures de fluorescence et biomasse faites à la fin de la période de croissance ont permis d'observer de fortes corrélations linéaires entre 1) le ratio  $FChl_{UV}/FChl_{BL}$  (TEUV de l'épiderme) et la concentration foliaire en azote (Samson et al. 2000), et 2) entre la production de grains et des ratios de  $FChl/FBV$  (Corp et al. 2003). Si la fluorescence est affectée par de faibles degrés de carence en N (faibles différences par rapport à la dose optimale), il est donc permis de suggérer que la fluorescence sera affectée précocement lors de l'induction d'une carence minérale.

L'autre aspect de la fluorodétection des carences minérales qui nécessite des études plus approfondies est une explication physiologique des variations de fluorescence causées par les carences minérales. La majorité des études de la fluorodétection ont porté sur les carences en N, qui sont les plus fréquentes puisque l'azote est l'élément minéral requis en plus grande quantité par la plante (Taiz et Zeiger, 2002). Il est maintenant bien admis qu'une carence en N entraîne une diminution de la TEUV de l'épiderme, donc une baisse de l'intensité de la  $FChl_{UV}$ , due à une accumulation de composés phénoliques (Mercure et al. 2004; Cartelat et al. 2005). Il a été proposé que ces accumulations de composés phénoliques dans l'épiderme sont causées par un désordre physiologique fréquent chez les végétaux, soit un déséquilibre de la relation source/puits, ou plus spécifiquement, une limitation puits. Les organes « source » sont les feuilles matures, capables de synthétiser les sucres nécessaires à la croissance de la plante et les organes « puits » sont ceux qui doivent importer les sucres produits par la photosynthèse afin d'assurer leur développement (jeunes feuilles en expansion, racines, fruits...). Lors de carences minérales en N et en P, la division et la croissance cellulaires sont plus ralenties que la photosynthèse (Sinclair et Vadez, 2002) et il y a une plus faible demande des organes puits en hydrates de carbone. Ces derniers s'accumulent donc dans les organes sources et favorisent la synthèse des composés phénoliques, selon la « Carbon overflow hypothesis » (Matsuki

1996). Ces réactions sont à la base du l'hypothèse Carbone/Nutriments, largement utilisée en écophysiologie végétale (Lambers et al. 1998). Ainsi, les baisses de la transmittance UV de l'épiderme observées lors de carence azotée ont été attribuées à une accumulation de composés phénoliques causées par une limitation puits (Mercure et al. 2004; Cartelat et al. 2005). Cependant, ces études se sont limitées à la carence en N et n'ont pas mesuré la photosynthèse, ne permettant pas d'établir une relation causale entre une limitation puits (croissance davantage inhibée que la photosynthèse), accumulation de composés phénoliques et variations de fluorescence.

Ce chapitre porte donc sur l'analyse et l'établissement d'une relation de cause à effet entre les paramètres de croissance, la photosynthèse, la concentration en chlorophylles et les paramètres de fluorescence pour les carences en N, P et K en fonction du temps. Cela permettra tout d'abord de vérifier la précocité de détection des carences minérales par la fluorescence induite par UV et aussi de fournir si possible une base plus solide permettant l'interprétation physiologique de la fluorodétection des carences minérales.

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Dispositif expérimental

Le matériel végétal et les conditions de croissance sont les mêmes que ceux décrits dans la section 3.2.1. Après germination et croissance pendant 2 semaines dans de la vermiculite, les plants de tournesol ont été acclimatés pendant 1 semaine en milieu liquide (solution Hoagland non-modifiée). Au début des traitements (Jour 0), les plants ont été divisés en deux groupes : les plants contrôle (solution Hoagland non-modifiée) et les plants cultivés dans la solution Hoagland modifiée en un seul élément (15%N, 0%P et 0%K). Les effets des carences N, P et K ont donc été étudiées en 3 expériences distinctes, chacune

répétées 2 fois. Les mesures de biomasse (poids frais) des racines et des parties aériennes des plants entiers furent prises aux jours 0, 2, 4, 7, 10, et 14 suivant le début des traitements (dénotés J0, J2, ... J14). Les mesures de photosynthèse, de fluorescence, de chlorophylles et de composés phénoliques ont été faites sur les jeunes feuilles (feuille 4) qui se sont développées durant les traitements. À cause de la petite taille des feuilles, les mesures n'ont été prises qu'aux jours J7, J10 et J14 suivant le début des traitements. À chaque jour de mesures, celles-ci ont été effectuées sur 5 plants contrôles et 5 plants carencés en N, P ou K.

#### **4.2.2 Mesures de biomasse**

La surface des feuilles 4 a été mesurée tel que décrit à la section 3.2.2. Les poids frais des feuilles 4, des racines et des parties aériennes (tiges + feuilles) ont été déterminés.

#### **4.2.3 Mesures de photosynthèse**

Les taux maxima de photosynthèse nette ont été mesurés sur les feuilles 4 grâce à un système de mesures d'échanges gazeux LCA4 (ADC BioScientific, Angleterre) sous une intensité lumineuse saturante ( $\approx 1200 \mu\text{moles photons. m}^{-2.\text{s}^{-1}}$ ).

#### **4.2.4 Mesures de fluorescence**

Le système d'imagerie de fluorescence utilisé pour mesurer les intensités et les ratios de fluorescence est décrit dans la section 3.2.4. Les mêmes

paramètres que dans le chapitre 3 étaient mesurés : la FBV, les ratios FBV/FChl<sub>UV</sub>, F685/F735 et la TEUV.

#### **4.2.5 Mesures des contenus foliaires en pigments photosynthétiques et en composés phénoliques solubles**

Les pigments photosynthétiques et les composés phénoliques solubles ont été extraits à partir de disques foliaires (feuille 4) finement broyés dans l'azote liquide, puis transférés dans du méthanol pur à 70°C pendant 30 à 45 minutes. Les chlorophylles *a* et *b* et les caroténoïdes totaux étaient dosés par absorbance selon la méthode de Lichtenthaler (1987).

Les composés phénoliques solubles totaux ont été extraits à partir de 0.5g environ de feuilles finement broyés dans l'azote liquide, bouillies dans du méthanol pur 2 fois pendant 20 min, et ensuite placées dans du méthanol 50%. Leur concentration a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Waterman et Mole, 1994) et exprimée en mg d'équivalent d'acide tannique par g de poids frais.

### **4.3 Résultats**

#### **4.3.1 Carence en azote**

Les paramètres de croissance des plants contrôles et carencés en N sont présentés dans la figure 4.1. Les premières diminutions significatives de croissance apparaissent au J10, où la surface (A) et le poids (B) de la 4<sup>ème</sup> feuille, ainsi que le poids total (C) des plants carencés en N deviennent significativement inférieurs à ceux des plants contrôles. Au J10, la surface et le poids des jeunes feuilles des plants carencés en N représentent 48% et 42% des valeurs des jeunes feuilles des plants contrôles. De plus, il est à noter que

le ratio des biomasses Racines/Parties aériennes des plants contrôles reste constant tout au long du traitement tandis que celui des plants carencés en N augmente significativement par rapport aux contrôles dès le J7 (Fig. 4.1D). Au J14, les valeurs de la surface et du poids de la 4<sup>ème</sup> feuille, du poids total et du ratio Racines/Parties aériennes des plants carencés par rapport aux plants contrôles étaient respectivement de 28%, 34%, 70% et 217%.

La figure 4.2 montre les valeurs moyennes aux J7, J10 et J14 des taux maxima de photosynthèse nette Pmax (Fig. 4.2A), des concentrations en chlorophylles a+b (Fig. 4.2B) et des composés phénoliques (Fig. 4.2C) chez les jeunes feuilles (feuille 4) des plants contrôles et de ceux carencés en N. Les valeurs de Pmax et des concentrations en chlorophylles restent constantes tout au long du traitement et sont similaires pour les plants contrôles et carencés. Ces résultats indiquent que la carence en N n'a pas affecté l'appareil photosynthétique de façon significative sous nos conditions expérimentales. Par contre, les composés phénoliques se sont accumulés à la fin du traitement (J14) de façon très significative ( $p<0,01$ ) dans les jeunes feuilles des plants carencés en N par rapport aux plants contrôles, une hausse de près de 300%. Un déséquilibre source/puits semble donc être à l'origine de l'accumulation des composés phénoliques chez les plants carencés en N.

Tel que montré dans la figure 4.3, l'effet de la carence en N n'a pas d'effet significatif tout au long du traitement sur la FBV (Fig. 4.3A) ainsi que sur le ratio F685/F735 (Fig. 4.3C) des jeunes feuilles. Par contre, on peut noter des fortes augmentations du ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> chez les jeunes feuilles des plants carencés par rapport à celles des plants contrôles : ces augmentations sont significatives dès le J7, et deviennent maximales au J14 (Fig. 4.3B). Cela est cohérent avec les résultats obtenus dans le chapitre 3 et considérant que la FBV n'est pas affectée par la carence en N (Fig. 4.3A), ceci indique clairement que l'augmentation du ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> est due à une diminution de la FChl<sub>UV</sub>. En effet, la TEUV de l'épiderme des jeunes feuilles des plants carencés N diminue

significativement par rapport aux plants contrôles à partir du J10. Cela est également consistent avec les résultats obtenus dans le chapitre 3 et montre que la diminution de la FChl<sub>UV</sub> serait plutôt due à une accumulation des composés phénoliques dans l'épiderme (d'où une diminution de la TEUV) plutôt qu'à une diminution de la concentration en chlorophylles (qui est inversement corrélé au ratio F685/F735).

#### **4.3.2 Carence en phosphore**

Les paramètres de croissance des plants contrôles et carencés en P sont présentés dans la figure 4.4. Tout d'abord, il est important de noter que les expériences portant sur les effets de la carence en P n'ont pu être continuées après 10 jours de traitements. En effet, les plants utilisés dans ces expériences étaient de façon générale plus gros ( $\approx 60$  g à J10) que ceux utilisés pour les expériences sur les carences en N et en K ( $\approx 45$  g à J10). Au J10, les valeurs de la surface et du poids de la 4<sup>ème</sup> feuille, du poids total et du ratio Racines/Parties aériennes des plants carencés en P par rapport aux plants contrôles étaient respectivement de 30%, 32%, 69% et 148%. Comme pour la carence en N, les premières différences significatives apparaissent à J7, où la surface et le poids de la 4<sup>ème</sup> feuille des plants carencés en P sont significativement plus faibles que ceux pour les plants contrôles.

Les effets de la carence en P sur les taux maxima de photosynthèse, sur les concentrations en chlorophylles *a+b* et en composés phénoliques sont présentés à la Figure 4.5. Les effets observés pour la carence en P sont semblables à ceux obtenus pour la carence en N : la photosynthèse (Fig. 4.5A) et la concentration en chlorophylles (Fig. 4.5B) des jeunes feuilles des plants carencés en P ne sont pas significativement différents des plants contrôles pendant le traitement. On peut cependant noter une augmentation de la photosynthèse des feuilles carencées en P entre le J7 et le J10. Enfin, les

concentrations en composés phénoliques aux J7 et J10 sont significativement plus élevées dans les feuilles carencées en P que celles des plants contrôles (Fig. 4.5C).

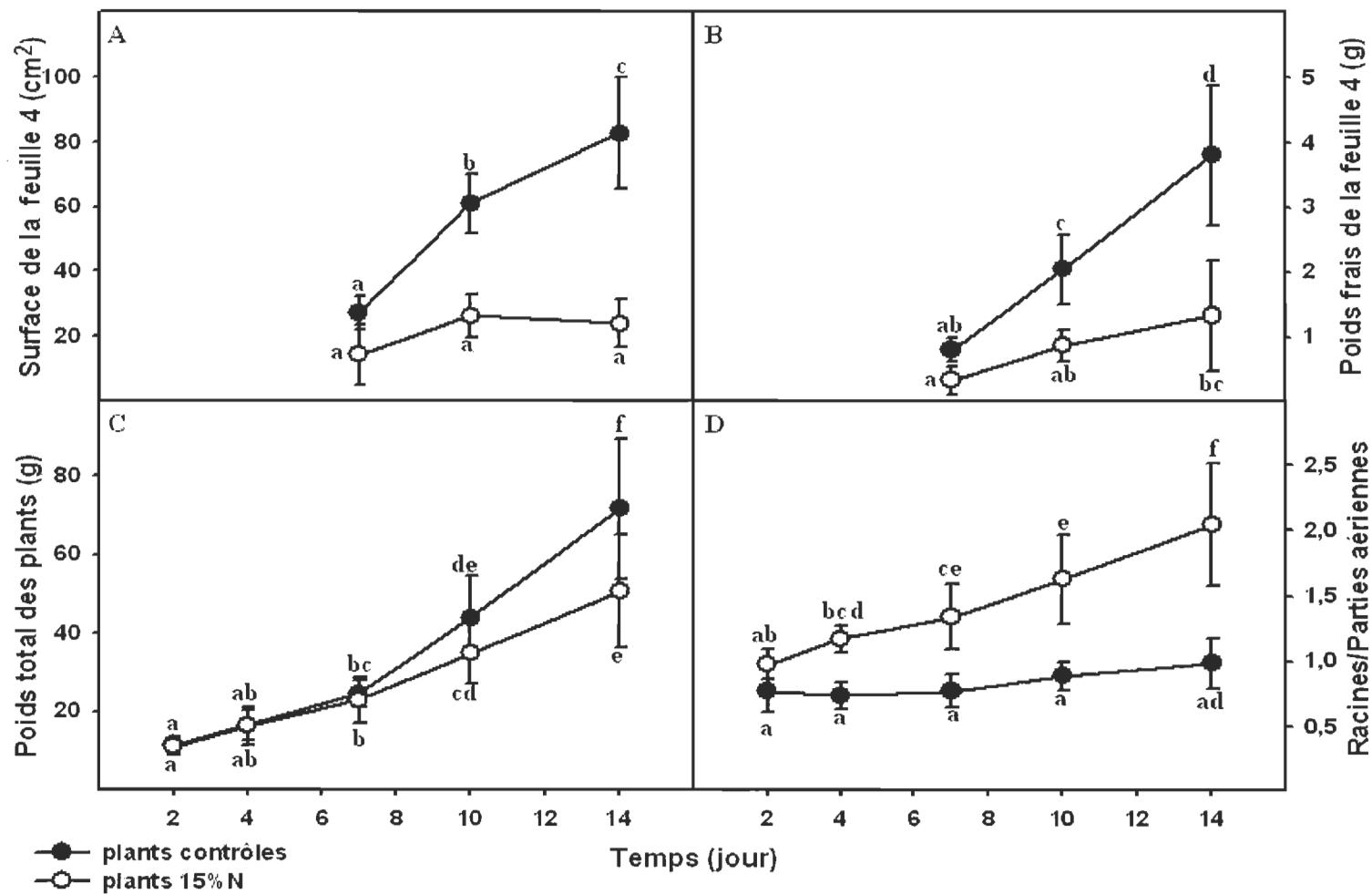
Quant aux effets de la carence en P sur les paramètres de fluorescence, on ne remarque pas d'effets significatifs sur la FBV (Fig. 4.6A) ni sur le ratio F685/F735 (Fig. 4.6C). Les hausses du ratio FBV/FChl<sub>UV</sub> des jeunes feuilles carencées en P ne sont significatives qu'à J7 tandis que la baisse de la transmittance UV de l'épiderme chez ces feuilles carencées devient significative qu'à J10 à cause des grandes barres d'erreur.

#### 4.3.3 Carence en potassium

Comme lors des expériences portant sur les carences en N et en P, les paramètres de croissance des plants contrôles et carencés en K ont été mesurés en fonction du temps de traitement (Fig. 4.7). Plusieurs différences cependant existent entre les effets des carences en N et en P et ceux de la carence en K. Tout d'abord, malgré les faibles valeurs apparentes de la surface et du poids de la 4<sup>ème</sup> feuille des plants carencés en K, les différences par rapport aux valeurs des feuilles des plants contrôles ne sont pas statistiquement significatives. En fait, les seules différences significatives de biomasse observées au cours de cette expérience sont celles du poids total des plants à J7 et J14. À la fin de l'expérience (J14), les valeurs de la surface et du poids de la 4<sup>ème</sup> feuille, celles du poids total et du ratio Racines/Parties aériennes des plants carencés en K par rapport aux plants contrôles étaient respectivement de 61%, 60%, 52% et ≈100%. Les inhibitions de croissance causées par la carence en K se distinguent donc de celles induites par les carences en N et en P par une inhibition plus marquée du poids total du plant que de la biomasse (surface et poids) de la feuille 4, et aussi par une absence totale d'effet sur le ratio Racines/Parties aériennes.

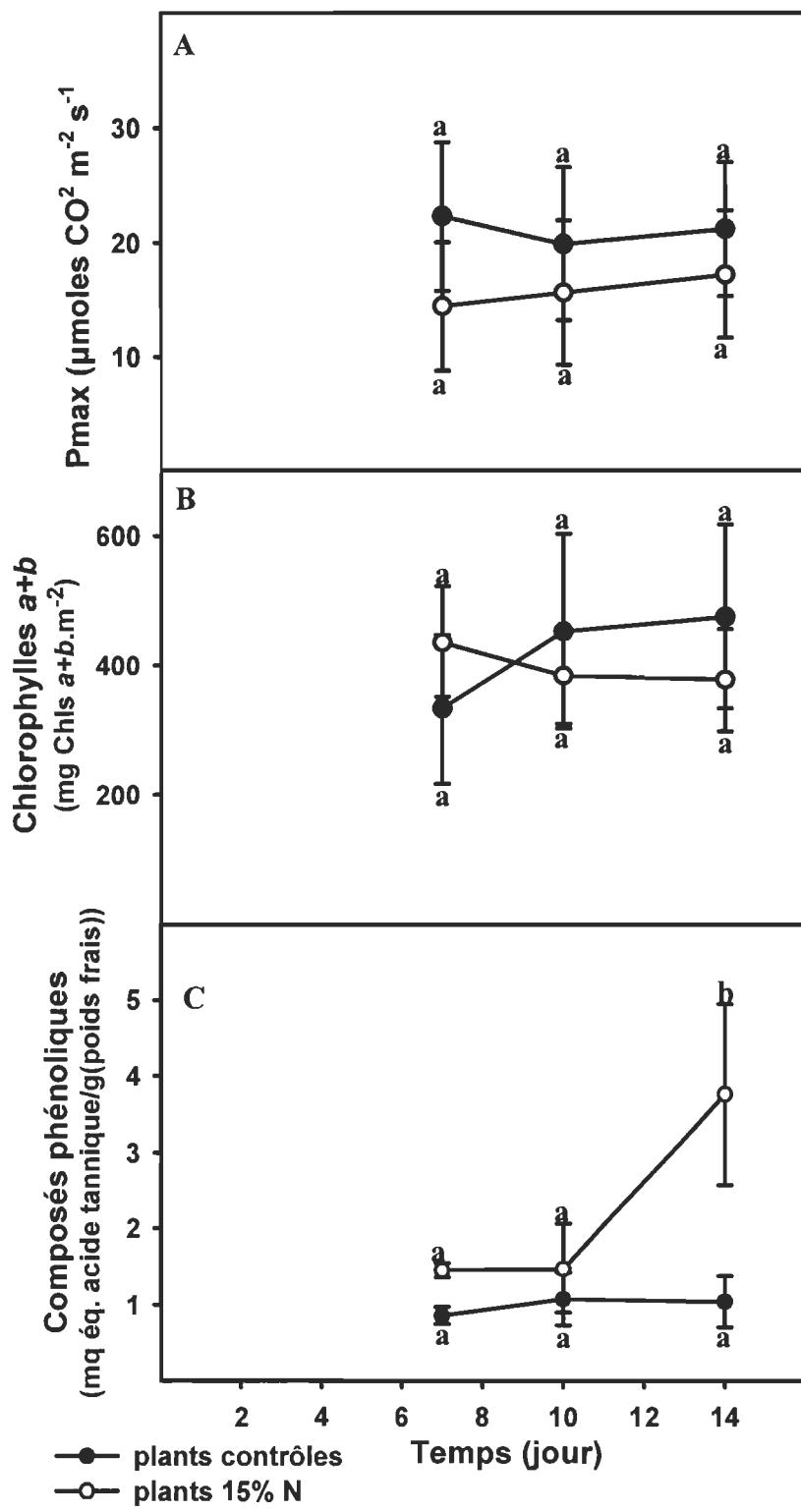
En plus de ses effets particuliers sur la croissance, la carence en K se distingue des carences en N et en P par ses effets sur la photosynthèse et sur les concentrations en composés phénoliques (Fig. 4.8). En effet, les feuilles 4 des plants carencés en K montrent par rapport à celles des plants contrôles des baisses significatives du taux maximum de photosynthèse (J7) et de la concentration en composés phénoliques (J14). Quant aux concentrations en chlorophylles *a+b*, aucune différence significative n'est observée entre les feuilles des plants carencés et normaux.

Enfin, pour ce qui est des effets de la carence en K sur les paramètres de fluorescence, il n'y a pas de différence significative entre les FBV (Fig. 4.9A), les ratios FBV/FChl<sub>UV</sub> (Fig. 4.9B) et F685/F735 (Fig. 4.9C), ainsi que les TEUV de l'épiderme chez les feuilles carencées et normales. Il est donc surprenant de constater que contrairement à ce qui a été observé dans le chapitre 3, la FBV des jeunes feuilles carencées en K ne présentent pas d'augmentation par rapport aux plants contrôles (Fig. 4.9A).



**FIGURE 4.1 : Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement.**

**A) surface de la feuille 4, B) poids de la feuille 4, C) poids total des plants, D) Poids des racines/Poids des parties aériennes.**



**FIGURE 4.2 : Taux maximum de photosynthèse (A), concentrations en chlorophylles (B) et concentrations en composés phénoliques solubles (C) des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement.**

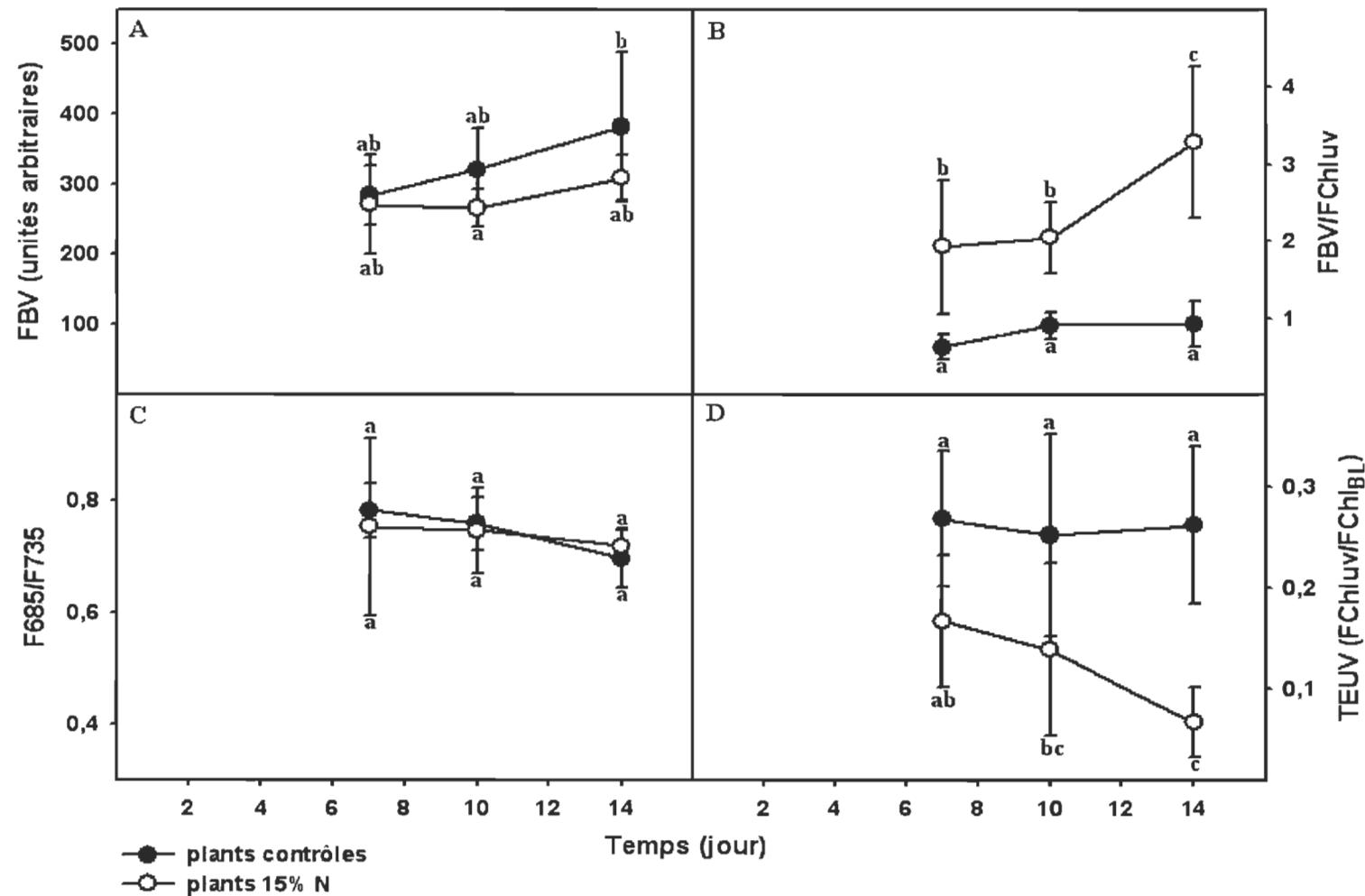
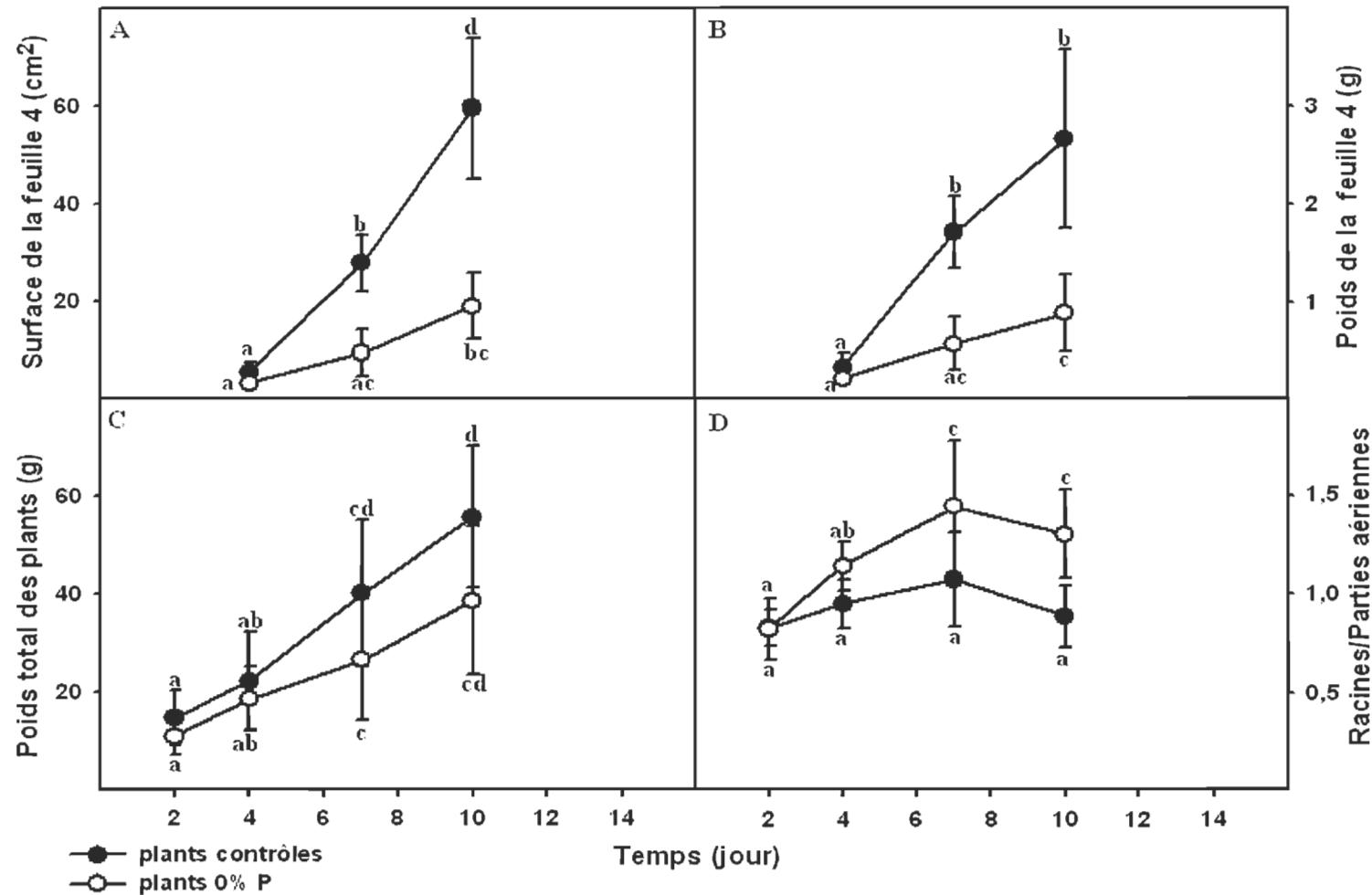
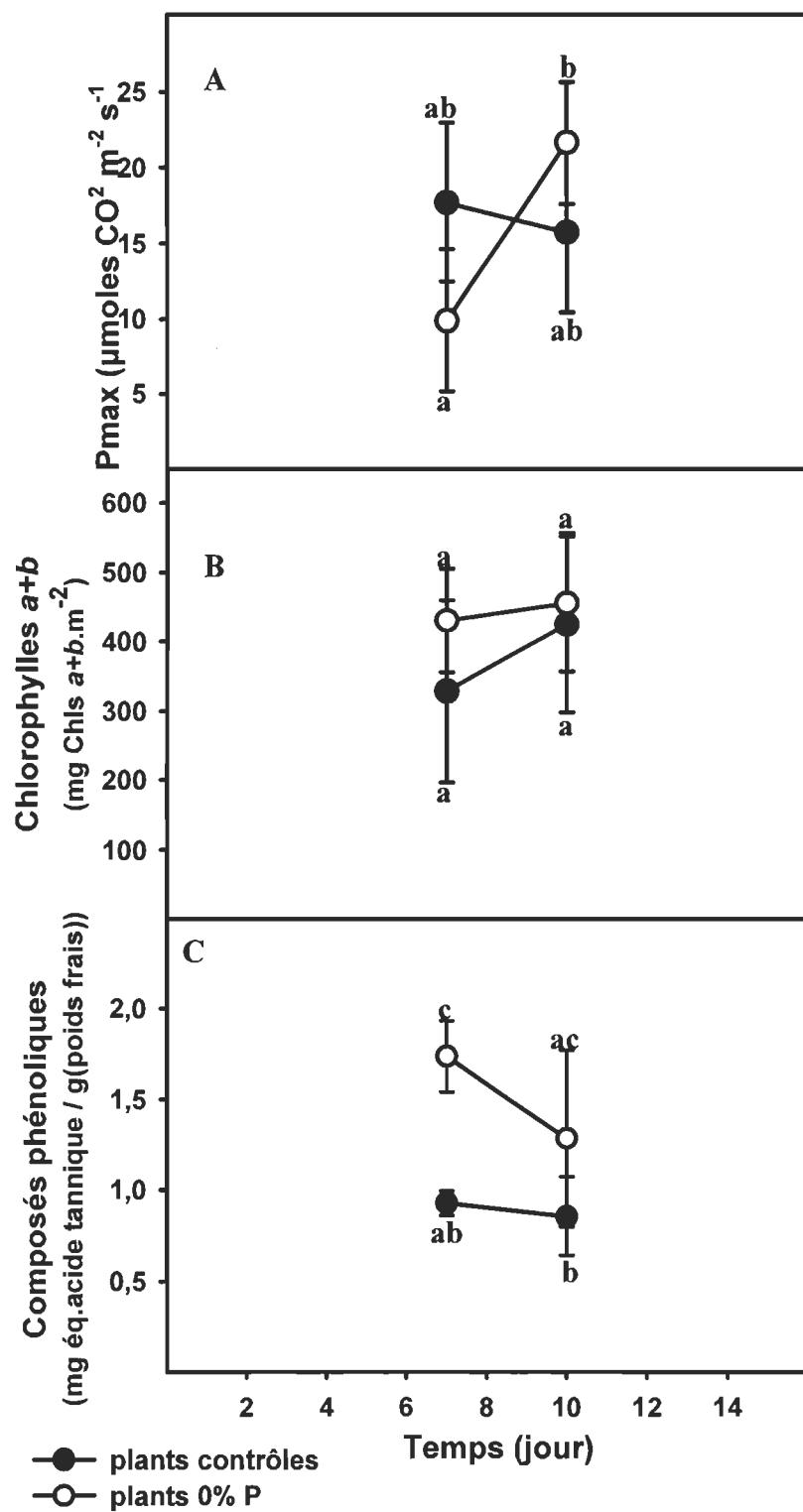


FIGURE 4.3 : Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en azote en fonction du temps de traitement. A) FBV; B) FBV/FChl<sub>UV</sub>; C) F685/F735; D) TEUV (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>)



**FIGURE 4.4 : Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement. A) surface de la feuille 4, B) poids de la feuille 4, C) poids total des plants, D) Poids des racines/Poids des parties aériennes.**



**FIGURE 4.5 : Taux maximum de photosynthèse, concentrations en chlorophylles et concentrations en composés phénoliques solubles des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement.**

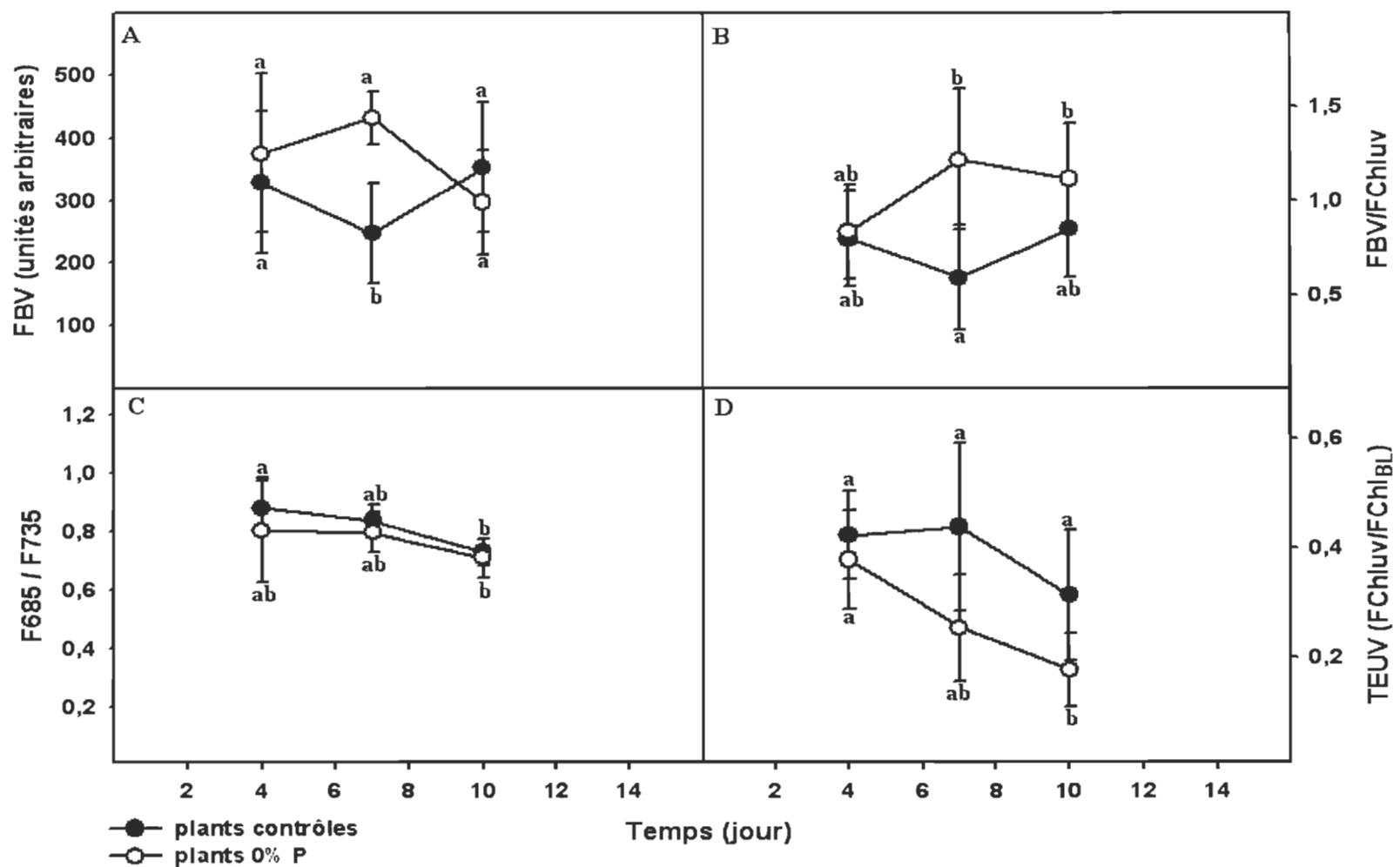
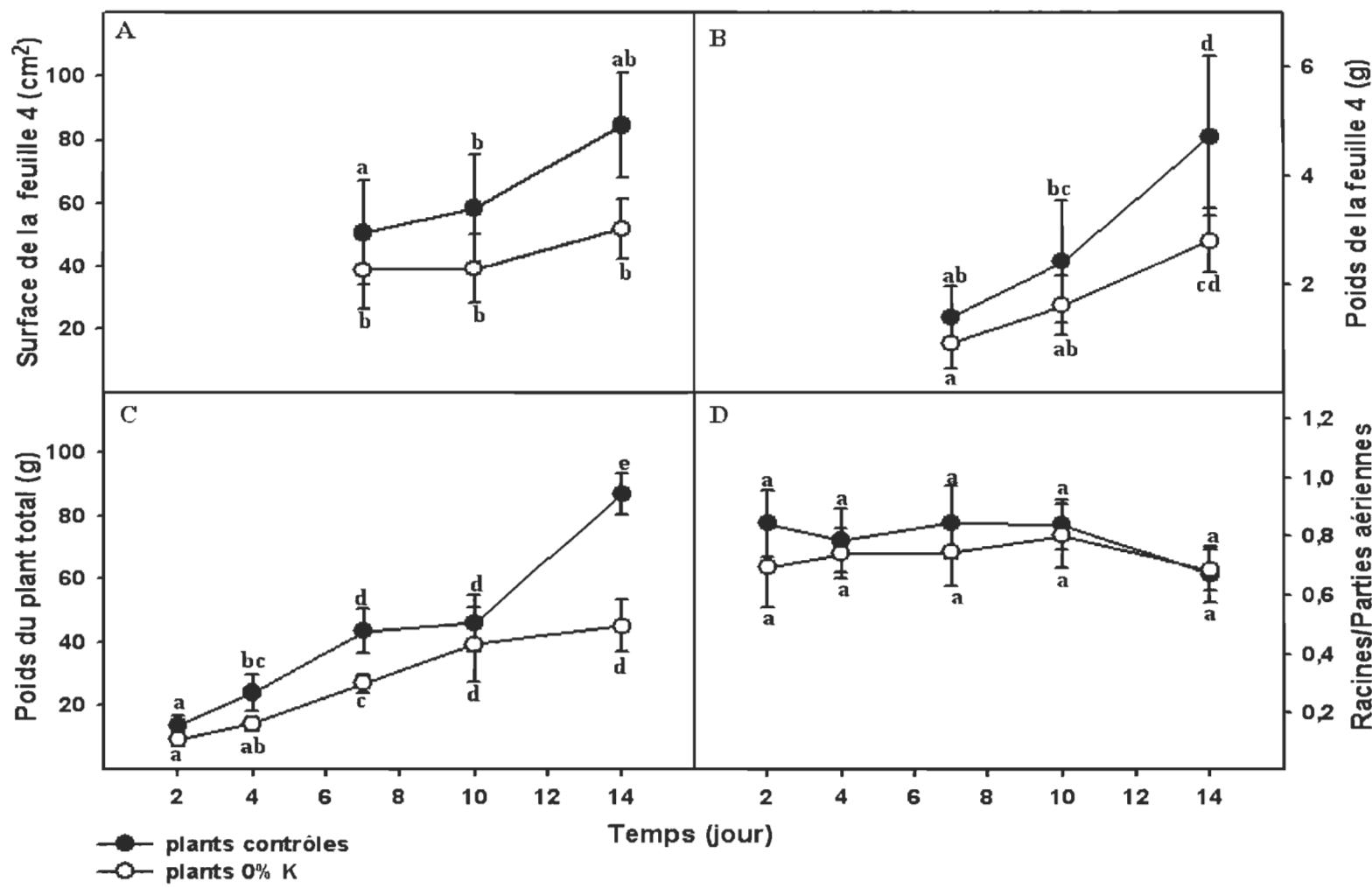
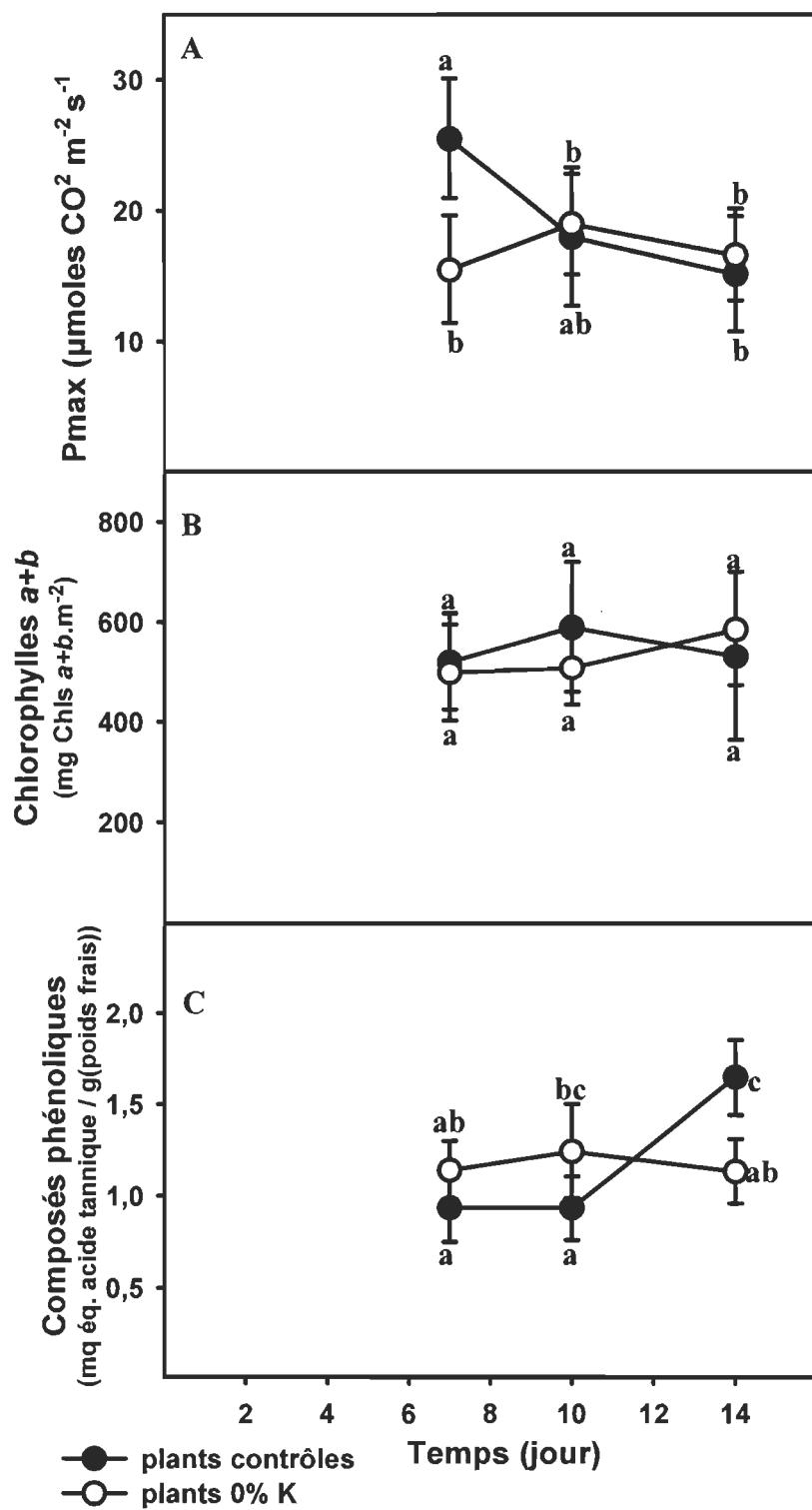


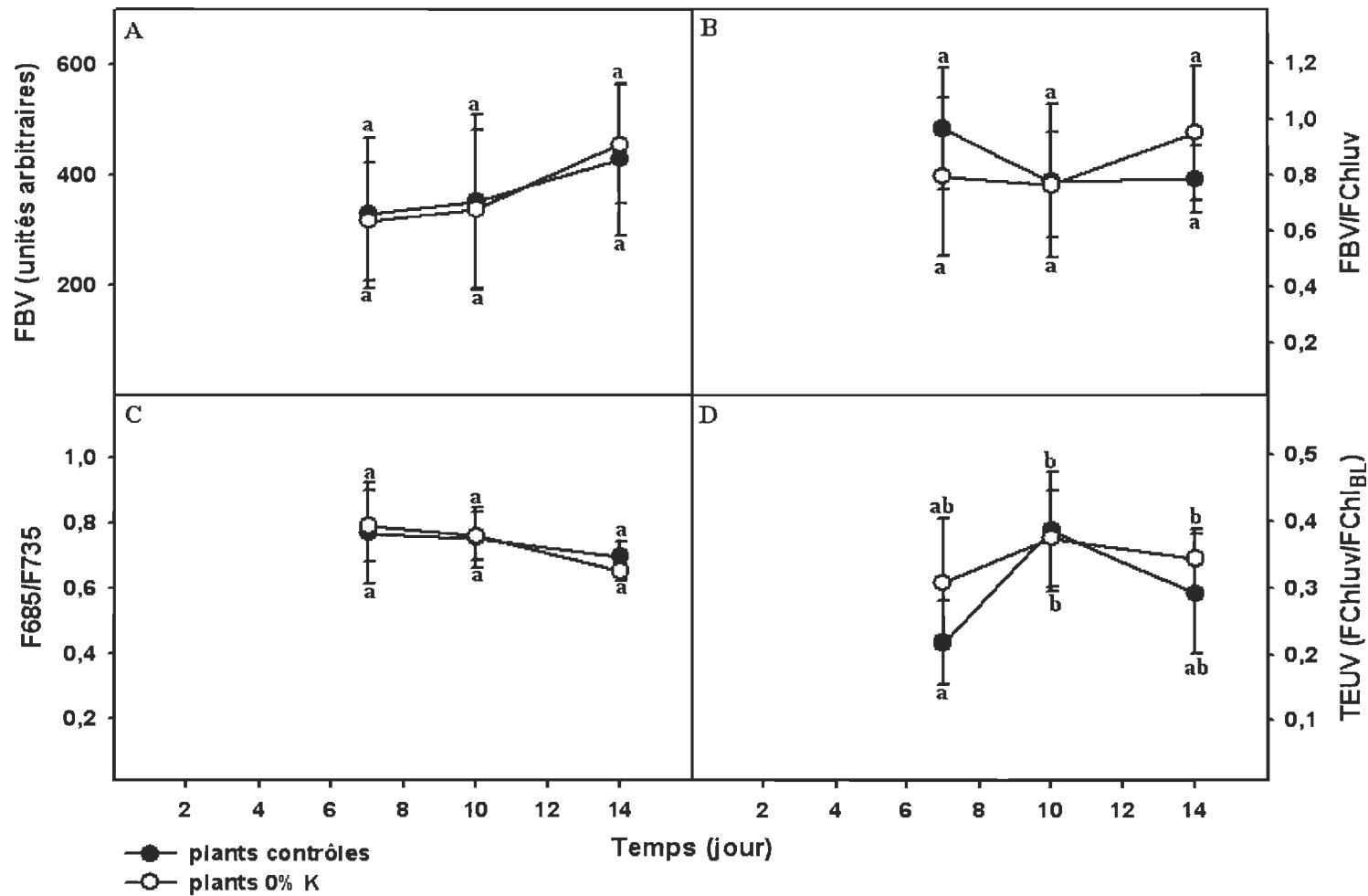
FIGURE 4.6 : Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en phosphore en fonction du temps de traitement. A) FBV; B) FBV/FChl<sub>UV</sub>; C) F685/F735; D) TEUV (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>)



**FIGURE 4.7 :** Paramètres de biomasse des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement. A) surface de la feuille 4, B) poids de la feuille 4, C) poids total des plants, D) Poids des racines/Poids des parties aériennes.



**FIGURE 4.8 : Taux maximum de photosynthèse, concentrations en chlorophylles, concentrations en composés phénoliques solubles des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement.**



**FIGURE 4.9 : Paramètres de fluorescence des feuilles 4 des plants contrôles et des plants carencés en potassium en fonction du temps de traitement. A) FBV; B) FBV/FChl<sub>UV</sub>; C) F685/F735; D) TEUV (FChl<sub>UV</sub>/FChl<sub>BL</sub>).**

## 4.4 Discussion

Il a été démontré dans le chapitre précédent que la fluorescence induite par UV est capable de détecter et de distinguer les carences en N, P et K. Afin de pouvoir exploiter le potentiel de la fluorescence induite par UV, il est également important d'évaluer la précocité de la fluorescence à détecter les différentes carences par rapport à l'inhibition de croissance et à l'apparition de symptômes visuels. De plus, l'interprétation sur une base physiologique de la fluorodétection des carences minérales doit aussi être clarifiée et approfondie afin de pouvoir établir une relation de cause à effet depuis les inhibitions de croissance jusqu'aux variations de fluorescence. Les résultats du chapitre 4 permettent de vérifier ces deux points grâce à la mesure des paramètres de croissance et de fluorescence en fonction du temps de traitement.

### 4.4.1 Précocité de la fluorescence à détecter les carences minérales

Tout d'abord, les plants cultivés en présence d'une solution minérale déficiente en N montrent une augmentation significative du ratio FBV/FChl (dès le J7) avant que les premières inhibitions significatives de croissance ne puissent être détectées, soit celles de la feuille 4 (surface et poids au J10). Il est à noter cependant que le ratio des biomasses Racines/Parties aériennes des plants carencés en N était augmenté significativement dès le J4. Quant à la carence en P, les premiers effets significatifs sur la croissance (surface et poids de la feuille 4) et la fluorescence (FBV et FBV/FChl<sub>UV</sub>) apparaissent en même temps (J7). Cependant, ces effets sur la FBV et FBV/FChl<sub>UV</sub> ne sont plus significatifs au J10 tandis que la TEUV de l'épiderme le devient. Contrairement aux observations faites chez les plants carencés en N, les augmentations transitoires de FBV et FBV/FChl<sub>UV</sub> (significatives qu'au J7) suggèrent un manque de fiabilité de ces paramètres à détecter la carence en P. Enfin, pour ce qui est de la carence en K, la seule diminution significative de la croissance

apparaît au J14 (poids total du plant) tandis qu'en aucun temps les paramètres de fluorescence diffèrent entre les plants contrôles et carencés en K. Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la précocité de la fluorescence des végétaux à détecter les carences minérales dépend de l'élément déficient. Si l'on considère l'efficacité de la fluorodétection comme étant fonction de sa précocité et sa fiabilité, nos résultats indiquent donc cette efficacité à détecter la carence varie ainsi : N > P >> K (considérant les résultats pour K dans le chapitre 3). La grande précocité de la fluorescence à détecter les carences en N est consistante avec les relations linéaires précédemment observées entre la TEUV de l'épiderme et la concentration foliaire en N (Samson et al. 2000) ainsi qu'entre la production de grains et des ratios de FChl/FBV (Corp et al. 2003).

#### **4.4.2 Base physiologique de l'interprétation de la fluorodétection des carences minérales**

L'impact des facteurs environnementaux sur les émissions de FBV et de FChl dépendent de leurs effets sur les concentrations foliaires en composés phénoliques et en chlorophylles (Buschmann et Lichthenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999). Puisque les carences en N, P et K n'ont causé aucune variation significative des concentrations en chlorophylles dans ce chapitre, leurs effets sur les paramètres de fluorescence résultent donc de ceux induits sur les composés phénoliques.

L'hypothèse CNB permet d'expliquer la variation des composés phénoliques en fonction de la disponibilité des ressources (Lambers et al. 1998). Selon cette hypothèse, la plus grande inhibition de la croissance par rapport à celle de la photosynthèse lorsque les ressources deviennent limitantes cause un déséquilibre source/puits (limitation puits). Ceci est bien admis chez les plants carencés en N et P, où la division et la croissance cellulaires sont plus ralenties que la photosynthèse (Sinclair et Vadez, 2002). L'excès de carbone réduit par la

photosynthèse qui en résulte favorise la synthèse de composés phénoliques (Matsuki, 1996; Lambers et al. 1998).

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent pour la première fois dans une même étude des résultats suggérant la relation causale chez des plants carencés en N et P entre la plus grande inhibition de la croissance que celle de la photosynthèse, l'accumulation des composés phénoliques et les variations de fluorescence (hausses de FBV/FChl et baisses de la TEUV de l'épiderme). À l'inverse, nous avons observés chez les plants de tournesol carencés en K une inhibition plus précoce de la photosynthèse (J7) que de la croissance (J14), une diminution de la concentration des composés phénoliques (J14) mais cependant, aucune variation significative de la fluorescence.

Il est évident que la carence en K cause des inhibitions de croissance différentes de celles causées par les carences en N et P. En effet, alors que l'inhibition de croissance était plus marquée chez les feuilles (F4) dans le cas des carences en N et P, les plants carencés en K présentaient une inhibition plus marquée de leur poids total. Aussi, le ratio Racines/Parties aériennes restait inchangé chez les plants carencés en K, alors qu'il augmentait tout au long de l'expérience pour les plants carencés en N et P. Ainsi les pourcentages (%) des valeurs de la surface de la feuille 4, du poids total des plants, et du ratio Racines/Parties aériennes étaient respectivement 28, 70, 217 pour la carence en N; 30, 69, 148 pour la carence en P; 61, 52, 100 pour la carence en K. De telles différences peuvent découler du fait que le N et le P font partie intégrante des métabolites primaires tandis que le K demeure libre sous une forme ionique (Taiz et Zeiger, 2002 ; Jones, 1998). Il est donc possible que ces différences soient responsables des effets opposés du N et P d'une part et du K d'autre part.

Deux facteurs compliquent la démonstration d'une relation causale entre la limitation puissante (i.e. croissance davantage inhibée que la photosynthèse), l'accumulation des composés phénoliques et les variations de fluorescence.

Tout d'abord, il reste difficile d'estimer clairement le degré de déséquilibre de la balance source/puits (limitation puits) chez nos plants carencés, puisque nous avons uniquement mesuré les taux maxima de photosynthèse nette sur une seule feuille (F4). Des mesures de taux *in situ* de photosynthèse nette sur des feuilles jeunes et matures, des mesures de taux de croissance, des concentrations de sucres solubles et d'amidon dans les différents organes auraient permis d'estimer plus précisément l'état de la balance source/puits chez nos plants. Deuxièmement, il faut reconnaître que l'hypothèse de la CNB prévoit les variations de composés phénoliques totaux qui sont relativement bien estimés par nos mesures de composés phénoliques solubles mesurés par la méthode Folin-Ciocalteu. Cependant, la TEUV de l'épiderme (ou plus précisément son absorbance UV) dépend directement de la concentration de composés phénoliques présents dans l'épiderme (Bilger et al. 1997, Buschmann et Lichthenthaler, 1998; Cerovic et al. 1999). Des relations linéaires entre l'absorbance UV de l'épiderme et la concentration de composés phénoliques solubles ont déjà été rapportées (Ounis et al. 2002; Barthod et al. 2007) chez des feuilles développées sous différentes intensités lumineuses. Cependant, des facteurs environnementaux tels des carences minérales pourraient affecter différemment les concentrations de composés phénoliques dans l'épiderme et dans le mésophylle (Kolb et Pfündel, 2005), affectant ainsi la relation entre la transmittance/l'absorbance UV de l'épiderme et la concentration de composés phénoliques solubles. Par exemple, il est possible que la baisse de composés phénoliques observée chez nos feuilles de tournesol carencées en K se produise préférentiellement dans le mésophylle des feuilles plutôt que dans l'épiderme.

## CONCLUSION

Mes résultats confirment non seulement le potentiel de la fluorescence induite par UV à détecter les carences minérales N, P et K mais aussi démontrent pour la première fois son potentiel à discriminer ces carences sur une même base d'inhibition de croissance. De plus, dans les cas des carences en N et en P, j'ai pu déterminer que leur détection peut être précoce, i.e. précédent ou coïncidant avec les premières inhibitions significatives de croissance.

Les variations des paramètres de fluorescence observées chez les plants carencés sont le résultat de changements de concentrations des composés phénoliques et/ou des chlorophylles. Certains de ces changements de concentrations peuvent s'expliquer par les modèles physiologiques tels que celui de la Balance Carbone/Nutriments, qui prédit la variation de la concentration des composés phénoliques en fonction des inhibitions relatives de la croissance et de la photosynthèse, i.e. l'équilibre source/puits de la plante sous conditions de stress environnementaux. Ainsi, les augmentations des concentrations en composés phénoliques solubles extraits des feuilles carencées en N et de celles carencées en P sont responsables des hausses du ratio BFV/FChl accompagnées des baisses de la transmittance UV de l'épiderme observées chez ces feuilles.

De plus, j'ai été en mesure de relier directement l'augmentation de l'intensité de la FChl chez les feuilles carencées en K à une diminution de la concentration en chlorophylles localisée à l'apex des feuilles grâce à l'imagerie de fluorescence, indiquant que la réabsorption de la FBV par la chlorophylle est un phénomène significatif à tenir compte dans l'interprétation des variations de l'intensité de la FBV. J'ai pu aussi montrer pour la première fois des images de la transmittance UV de l'épiderme des feuilles, qui diminuait chez les feuilles carencées en N et en P. Les techniques d'imagerie ont donc un grand intérêt dans la détection des carences et dans la compréhension des variations de fluorescence des feuilles.

Les chapitres 3 et 4 montrent des effets similaires de la carence en N sur les paramètres de fluorescence (hausse du ratio BGF/FChl et baisse de la transmittance UV de l'épiderme). Ces observations sont aussi semblables à celles déjà rapportées dans la littérature. Par contre, les différences observées entre les résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 quant aux effets de la carence en P sur le ratio F685/F735 et de la carence en K sur l'intensité de la FBV suggèrent que ces carences n'ont pas des effets aussi caractéristiques sur l'émission de fluorescence que ceux causés par la carence en N. Donc, si l'on considère l'efficacité de fluorodétection des carences comme étant fonction de la précocité et de la fiabilité, on peut établir que l'efficacité de la fluorescence à détecter les carences varie ainsi : N>P >> K.

Les travaux de ce mémoire de maîtrise démontrent donc le potentiel de la fluorescence à détecter et discriminer les carences en N, P et K chez le tournesol. Toutefois, beaucoup reste à faire avant de pouvoir appliquer la fluorescence dans la détection des carences au champ. D'autres études sont nécessaires pour distinguer les effets des carences sur la fluorescence de ceux dus aux espèces, aux stades de développement, à la température, à l'intensité de la lumière ambiante. Aussi, il faudra éventuellement quantifier des besoins minéraux (quantité d'engrais à appliquer) sur la base des variations de fluorescence observées par rapport à des valeurs préétablies ou par rapport à des plants témoins. Si le travail à faire semble énorme, les enjeux économiques, démographiques et environnementaux auxquels fait face l'agriculture le sont encore plus.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M.L., Norvell W.A., Philpot, W.D, Peverly, J.H., (2000) "Spectral detection of micronutrient deficiency in Bragg Soybean", *Agronomy Journal* 92: 261-268.
- Atherton, B.C., Morgan, M.T., Shearer, S.A., Stombaugh, T.S., Ward, A.D. (1999) Site-specific farming, *The Journal of Soil and Water Conservation*. 2nd Quarter: 455-461.
- Barthod, S., Cerovic, Z., Epron D., (2007) "Can dual chlorophyll fluorescence excitation be used to assess the variation in the content of UV-absorbing phenolic compounds in leaves of temperate tree species along a light gradient?" *Journal of experimental Botany* 58: 1753–1760.
- Belzile, C. Bélanger, M.C., Viau, A.A., Chamberland, M., Roy, S.A. (2003) "An operational fluorescence system for crop assessment" Photonic East Symposium, 27–31 October 2003, Providence, Rhode Island, USA.
- Bilger, W., Veit, M., Schreiber, L., Schreiber, U. (1997) "Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence", *Physiologia Plantarum* 101: 754-763.
- Briantais, J.M, Vernotte, C., Krause, G.H., Weise, E. (1986) "Light emission by plants and bacteria", Govindjee, Ames J, Fork DJ editions, New York Academy Press, 539-583.
- Buschmann, C., Langsdorf, G., Lichtenthaler, HK. (2000) "Imaging of the blue, green and red fluorescence emission of plants", *Photosynthetica* 38: 483–491.
- Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K. (1998) "Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants", *Journal of Plant Physiology* 152: 297-314.
- Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y. et al. (2005) "Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.) ", *Field Crops Research* 91: 35–49.
- Cerovic, Z.G, Goulas, Y., Gorbunov M., Briantais, J.M., Camenen, L., Moya, I., (1996) "Fluorosensing of water stress in plants: Diurnal changes of the mean lifetime and yield of chlorophyll fluorescence, measured simultaneously and at distance with a t-LIDAR and a modified PAM-fluorimeter, in maize, sugar beet, and Kalanchoe", *Remote Sensing Environnement* 58 (3): 311-321.
- Cerovic, Z.G, Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., Moya, I. (1999) "Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring : present state and prospects", *Agronomie* 19: 543-578.

- Chappelle, E.W., McMurtrey, J.E., Wood, F.M., Newcomb, W.W (1984) "Laser-induced fluorescence of green plants caused by nutrient deficiencies in corn", Applied Optics 23: 139-142.
- Corp, L.A., McMurtrey, J.E., Chappelle, E.W., Daughtry, C.S.T., Kim, M.S. (1997) "UV band fluorescence (*in vivo*) and its implications for the remote assessment of nitrogen supply in vegetation", Remote Sensing of Environment 61: 110-117.
- Corp, L.A., McMurtrey, J.E., Middleton, E.M., Mulchi, C.L., Chappelle, E.W., Daughtry, C.S.T. (2003) "Fluorescence sensing systems: *in vivo* detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply", Remote Sensing of Environment 86: 470-479.
- Cosgrove, D.J. (1997) "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants", Annual Review of Cell and Developmental Biology 13: 171-201.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995) "Stress-induced phenylpropanoid metabolism" Plant Cell 7: 1085-1097.
- Easton, Z.M., Petrovic, A.M. (2004) "Fertilizer source effect on ground and surface water quality in drainage from turfgrass", Journal of Environmental Quality 33 (2): 645-655.
- Fry, S.C. (1986) "Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms", Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 37: 165-186.
- Gitelson, A., Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K., (1998) "The chlorophyll fluorescence ratio F-735/F-700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants", Remote Sensing of Environment 69(3): 296 - 302.
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A. and Moya, I. (2004) "Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal UV-absorbance by chlorophyll fluorescence", Applied Optics 43(2): 4488-4496.
- Govindjee (1995) "Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence", Australian Journal of Plant Physiology, 22: 131-160.
- Heisel, F., Sowinska, M., Miehé, J.A., Lang, M., Lichtenthaler, H.K (1996) "Detection of nutrient deficiencies of Maize by laser induced fluorescence imaging", Journal of Plant Physiology 148:622-631.
- Jones, J.B Jr (1998) "Plant Nutrition Manual", CRC Press, USA.

- Knogge, W., Weissenböck, G. (1986) "Tissue distribution of secondary phenolic metabolites biosynthesis in developing primary leaves of *Avena sativa* L.", *Planta* 167: 196-205.
- Kolb, CA., Pfundel, EE. (2005) "Origins of non-linear and dissimilar relationship between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley", *Plant, Cell and Environment* 25: 580-590.
- Kraus, G., Weis, E. (1991) "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Lambers, H., Chapins, F.S., Pons, T.L (1998) "Plant Physiological Ecology", Springer, New-York.
- Larcher, W. (2003) "Physiological Plant Ecology", Springer, New York.
- Langsdorf, G., Buschmann, C., Sowinska, M., babani, F., Mokry, M., Timmerman, F., et Lichtenthaler, H.K. (2000) "Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation", *Photosynthetica* 38(4): 539-551.
- Lenk, S., Chaerle, L., Pfundel, E.E., Langsdorf, G., Hagenbeek, D., Lichtenthaler, H.K., Van Der Straeten, D., Buschmann, C., (2007) "Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications", *Journal of Experimental Botany* 58(4): 807-814.
- Lichtenthaler, H.K (1987) "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes", *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Lichtenthaler, H.K, Miehé, J.A (1997) "Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress", *Trends in plant sciences* 2(8): 316-320.
- Lichtenthaler, H.K, Schweiger, J. (1998) "Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants", *Journal of Plant Physiology* 152: 272-282.
- Marschner, H. (2002) "Mineral Nutrition of Higher Plants", Elsevier Science Ltd., Londres.
- Matsuki M., (1996) "Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution", *Australian Journal of Botany* 44: 613-634.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) "Chlorophyll fluorescence-a practical guide", *Journal of Experimental Botany* 51, 345: 659-668.

McMurtrey, J.E.I., Chappelle, E.W., Kim, M.S., Meisinger, J.J., Corp, L.A. (1994) "Distinguishing nitrogen fertilization levels in field corn (*Zea mays* L.) with actively induced fluorescence and passive reflectance measurements", *Remote Sensing Environment* 47: 36-44.

Mercure, S.A., Daoust, B., Samson, G. (2004) "Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants", *Canadian Journal of Botany* 82(6): 815-821.

Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I., Cerovic, Z.G (2003) "UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing", *Journal of Experimental Botany* 383: 757-769.

Northup, R.R., Yu, Z., Dahlgren, R.A., Vogt, K.A (1995) "Polyphenol control of nitrogen release from pine litter", *Nature* 377: 227-229.

Ounis, A., Cerovic, Z.G, Briantais, J.M, Moya, I. (2001) "Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies", *Remote sensing of sensing of environnement*, 76:33-48.

Penuelas, J., Filella, I. (1998) "Technical focus: Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status", *Trends in plant science* 3(4): 151-156.

Pfündel, E.E., Neubohn, B. (1999) "Assessing Photosystem I and Photosystem II distribution in leaves from C4 plants using confocal laser scanning microscopy", *Plant, Cell and Environment* 22 : 1569-1577.

Pfündel, E.E., Ben Ghzlen, N., Meyer, S., Cerovic, Z.G. (2007), "Investigating UV screening in leaves by two different types of portable UV fluorimeters reveals *in vivo* screening by anthocyanins and carotenoids", *Photosynthesis Research*, 93 (1-3).

Samson, G., Tremblay, N., Dudelzak, A.E, Babichenko, S.M., Dextraze, L., Wollring, J. (2000) "Nutrient stress of corn plants: early detection and discrimination using a compact multiwavelength fluorescent lidar", *Proceedings of the EARSeL Workshop on LIDAR Remote Sensing of Land and Sea*.

Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M. (2002) "The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes", *Journal of Experimental Botany* 53(379): 2381-2392.

Sinclair, T.R., Vadez, V. (2002) "Physiological traits for crop yield improvement in low N and P environments", *Plant and Soil* 245: 1-15.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002) "Plant Physiology", Troisième édition, Editions Sunderland, Massachusetts.

Wagner, H., Gilbert, M., Wilhelm, C. (2003) "Longitudinal leaf gradients of UV-absorbing screening pigments in barley (*Hordeum vulgare*)", *Physiologia Plantarum* 117: 383-391.

Waring, R.H, McDonald, A.J.S, Larsson, S., Ericsson, T., Wiren, A., Arwidsson, E, Ericsson, A., Lohammar, T. (1985) "Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition", *Oecologia*, 66: 157-160.

Waterman, P.G, Mole, S. (1994) "Analysis of phenolic plant metabolites", Blackwell, Oxford.

Wink, M. (1999) "Biochemistry of plant secondary metabolism", Annual Plant Reviews, Volume 2, CRC Press LLC, USA.