

La fluorescence chlorophyllienne au service des productions végétales

Murielle Eyletters*, David Ooms**, Marie-France Destain**

* Aliwen SA, 54, avenue Georges Lemaitre, 6041 Gosselies, Belgique

** Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Département des sciences et technologies de l'environnement, Unité de mécanique et construction, 2, passage des déportés, 5030 Gembloux, Belgique

d.ooms@ulg.ac.be

Toujours en quête d'informations quantitatives sur les phénomènes physiologiques complexes, l'agronome peut trouver une réponse dans l'analyse de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne émise par les végétaux. Il dispose alors d'un index de vitalité qui le guide dans l'appréciation précise de l'effet de stress biotiques ou abiotiques de l'environnement en se basant sur la photosynthèse des plantes, véritable carrefour biologique sur lequel se répercutent ces stress.

Lors des étapes photochimiques primaires de la photosynthèse, l'énergie lumineuse est absorbée par l'antenne pigmentaire du photosystème II composée des chlorophylles a, b et ab, et de caroténoïdes. Cette énergie est piégée par le centre réactionnel (chlorophylle piège) afin de déclencher une séparation de charge entre un donneur et un accepteur d'électrons. Le transfert d'électrons qui s'ensuit, via les différents transporteurs insérés dans la membrane thylacoïdienne*¹ des chloroplastes, contribuera à la transformation de l'énergie lumineuse en cette énergie chimique, tellement essentielle à tous les processus métaboliques du végétal.

Ces trois étapes fondamentales d'enclenchement de la photosynthèse, à savoir l'absorption, le piégeage de la lumière et le transfert d'électrons, peuvent être quantifiées en mesurant une voie de dissipation énergétique parallèle à la voie photochimique : la fluorescence chlorophyllienne. Lorsque les pigments, et en particulier les chlorophylles, reçoivent des photons, ils passent d'un état fondamental à un état excité pour revenir ensuite vers l'état fondamental via différentes voies interdépendantes : l'émission de chaleur, de lumière (fluorescence) et la photochimie (**figure 1**). Ainsi, si l'activité photosynthétique est perturbée par un environnement défavorable, la dissipation d'énergie (chaleur et fluorescence) devra compenser cette baisse. Dès lors, la fluorescence chlorophyllienne peut être considérée comme un indicateur intrinsèque des premières étapes de la photosynthèse, et son intensité liée au rendement photosynthétique du végétal. La fluorescence chlorophyllienne est ainsi un indicateur photosynthétique de la vitalité des végétaux.

L'appareil photosynthétique, et en particulier le photosystème II, est très sensible et induit des changements constants dans son organisation pour maintenir un fonctionnement optimal alors que son environnement est en perpétuelle mutation.

Application dans le diagnostic de vitalité des arbres urbains

La technique de fluorescence chlorophyllienne est particulièrement bien adaptée pour effectuer un *monitoring* in vivo des plantes en détectant et en évaluant les changements dans la cinétique rapide de fluorescence de la chlorophylle émise par les plantes et enregistrée par des appareils à haute résolution (d'une microseconde à une seconde).

Pour une feuille dont l'appareil photosynthétique a été mis à l'obscurité puis exposé à un flash lumineux d'intensité saturante, on peut observer une émission de fluorescence en deux phases : une augmentation rapide jusqu'à un maximum (fluorescence élevée, photosynthèse pas encore enclenchée), atteint en une seconde, suivi d'un déclin pour atteindre un état stationnaire (photosynthèses enclenchée, fluorescence basse). C'est l'effet Kautsky (**figure 2**). L'adaptation préalable à l'obscurité permet de vider la chaîne de transport des électrons. L'accepteur primaire d'électrons (une quinone) est alors sous sa forme oxydée et les centres réactionnels sont dits ouverts.

L'analyse de la cinétique rapide de fluorescence permet de déduire des points remarquables et de les introduire dans des formules appelées JIP-test (en référence aux lettres correspondant aux points

d'inflexion caractéristiques de la courbe de fluorescence émise par la plante, voir figure) issues de la théorie des flux dans les biomembranes développée par Reto Strasser et ses collègues du laboratoire de bioénergétique de l'université de Genève (1). Un index global (index de performance photochimique ou index de vitalité) intégrant le rendement des différentes étapes de ces réactions photochimiques (absorption, piégeage de l'énergie lumineuse et transfert d'électrons) peut être calculé pour estimer la vitalité de l'arbre. Les fluctuations de cet index de vitalité nous permettent de savoir si un arbre dépérit et à quel stade de son dépérissement il se trouve.

De même, il est possible de percevoir de manière précoce, avant même l'apparition de symptômes visibles, les effets sur la vitalité d'un arbre d'une carence en éléments nutritifs ou d'un manque d'eau et de mettre rapidement en place les traitements thérapeutiques adéquats. La mesure de la fluorescence chlorophyllienne permet également de quantifier l'efficacité de ces traitements (2).

Cette méthode connaît également d'autres applications. En agriculture par exemple, l'index de vitalité de la culture permet de quantifier l'efficacité de traitements phytosanitaires. Des tests ont ainsi été réalisés sur vigne pour montrer l'efficacité d'un fertilisant foliaire pour quantifier l'efficacité de produits tels qu'un fertilisant foliaire à base d'algues. Il est également possible de distinguer la réponse de plantes issues de variétés différentes pour une même céréale soumise à une sécheresse et de réaliser un criblage précoce des semences, de façon à guider les programmes de sélection classique en identifiant les plantes résistantes ou sensibles à la sécheresse.

Enfin, des applications émergent dans la lutte contre la désertification : dans le cadre d'un programme de reboisement, la fluorescence chlorophyllienne a permis de mettre en évidence l'accroissement de vitalité et de résistance de jeunes arbres mycorhizés et plantés dans des conditions extrêmes de croissance. Une comparaison de l'index a été réalisée entre les plants avec et sans mycorhizes (champignons symbiotiques) sur un même site, de manière à quantifier l'efficacité de cette symbiose dans ces conditions particulières de croissance.

Suivre la maturation des fruits

Dans le cycle de reproduction des végétaux angiospermes et gymnospermes, la semence joue un rôle essentiel. Chez les angiospermes, les semences croissent et se développent généralement dans les fruits, qui présentent une très grande variété : petit et sec comme l'akène*² ou charnu comme la baie de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Les fruits sont parfois très petits et inclus dans ou sur une structure supplémentaire, comme pour les fraises (*Fragaria vesca* L.), où les akènes sont disposés sur un réceptacle charnu issu de l'inflorescence, et les pommes (*Malus* sp.), dont le pédoncule floral, charnu, entoure le fruit proprement dit.

Chacun apprend à distinguer les fruits comestibles « mûrs » des immatures, principalement par la couleur, la fermeté et l'odeur. La véraison marque le début du changement de couleur : de vert à jaune, orange, brun ou rouge. Cela est dû à la dégradation progressive des chlorophylles dans les tissus superficiels, laissant apparaître les autres pigments. Ce phénomène n'est qu'un indicateur des bouleversements que subissent les tissus sous-jacents : accroissement de la respiration, solubilisation des composés pectiques, diminution des acides organiques et enrichissement en saccharoses... La mesure de la fluorescence permet ici de quantifier la chlorophylle dans les tissus superficiels tout au long de sa dégradation et ainsi d'évaluer l'état de maturité du fruit.

Évaluer les propriétés de conservation des fruits et des légumes

Les qualités organoleptiques des fruits ne sont pas les seules propriétés détectables par le biais de la fluorescence chlorophyllienne. Tout comme les feuilles, les tissus externes des fruits contiennent souvent des structures photosynthétiques actives, dont l'état physiologique peut être affecté par des épisodes de stress dû au froid, au gel, à une atmosphère modifiée pour le stockage ou à la chaleur (3). Certains paramètres utilisés pour la détection du stress dans les feuilles des végétaux sont alors applicables aux fruits puisque, comme pour les feuilles, ils sont corrélés aux changements dans la cinétique rapide de fluorescence de la chlorophylle émise par les tissus superficiels.

Un indicateur de la viabilité des semences

Les semences elles-mêmes subissent plusieurs transformations pendant leur croissance et leur maturation : la différenciation des tissus, l'expansion cellulaire et le séchage (4). Chez les tomates par exemple, la chlorophylle joue un rôle dans le développement des semences. Dans un premier temps, elle est nécessaire à leur développement. Ensuite, la décroissance de la quantité de chlorophylle correspond à une augmentation des performances de germination. C'est au cours de cette phase que la chlorophylle devient un indicateur de la maturité des semences. Cependant, après la date optimale de récolte des semences la quantité résiduelle de chlorophylle n'est plus un indicateur de leur pouvoir germinatif (5). L'application de la fluorescence chlorophyllienne à la détection des semences immatures est actuellement réalisée à petite échelle pour des semences maraîchères mais elle pourrait également l'être pour les grandes cultures. Il faut cependant tenir compte du débit plus important de semences à trier, ce qui impose des contraintes techniques. En effet, la sensibilité élevée n'est plus assurée en raison du temps d'exposition limité. De plus, chaque espèce a ses caractéristiques propres. Pour la chicorée par exemple (6), les semences commerciales sont des fruits secs entiers (cypsèles), dont la physiologie peut différer sensiblement de celle de la semence nue.

Un outil pour la sécurité des aliments

Les tubercules de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.) exposés à la lumière sont le siège de transformations caractéristiques des tissus. L'apparition de chlorophylle est concomitante à celle de glycoalcaloïdes (7), qui affectent le goût et sont toxiques pour le consommateur lorsqu'ils sont présents en quantité importante (8). Grâce à une sensibilité très élevée, l'imagerie fluorescente pourrait remplacer avantageusement l'imagerie couleur actuellement envisagée (9) pour la détection des tubercules atteints (figure 3). La fluorescence chlorophyllienne reste, en effet, détectable à des concentrations très faibles (de l'ordre du mg/kg) et la mesure n'est pas altérée par les variations naturelles de couleur des tubercules ou d'autres défauts visibles.

Des applications à développer

La technique de mesure de la fluorescence chlorophyllienne a permis de mener des recherches approfondies dans le domaine de la physiologie végétale. Elle fournit des informations précieuses qui méritent d'être davantage exploitées. Il existe aujourd'hui des appareils de terrain faciles à mettre en œuvre pour mesurer la cinétique de la fluorescence des végétaux in situ (photo), ainsi qu'une grande variété de dispositifs d'imagerie fluorescente adaptables à tous les types de produits végétaux. Certains appareils de laboratoire permettent également de combiner des mesures cinétiques avec l'imagerie. Un large panel d'utilisateurs en bénéficie désormais dans les domaines de la croissance, de la récolte, du stockage et du contrôle de qualité des productions végétales. Reste que les informations précieuses obtenues grâce à ces technologies méritent d'être davantage exploitées.

*¹ Membrane interne du chloroplaste, siège de la photosynthèse

*² Fruit sec dont l'enveloppe de la graine unique n'est pas soudée à celle-ci et qui ne s'ouvre pas quand le fruit arrive à maturité (par exemple, noisette, gland, châtaigne).

(1) Strasser RJ, Stirbet AD (1998) *International Symposium on Mathematical Modelling and Simulation in Agricultural and Bio-Industries* 48, 3-9

(2) Eyletters M (2001) *Cahier de l'arbre actuel* 6, 53-5

(3) Dell JR, Toivonen PMA (2003) in *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishers, 203-42

(4) Kermodé A (2006) in *The encyclopedia of seeds - Science, technology and uses*, Wallingford, UK, CABI, 405-6

(5) Suhartanto M (2002) Thèse, Wageningen Universiteit

(6) Ooms D, Destain MF (2009) *Biotechnol Agron Soc Environ*, sous presse

(7) Edwards EJ, Cobb AH (1997) *J Agric Food Chem* 45, 1032-8

(8) van Gelder WMJ (1990) in *Poisonous Plants Contaminating Edible Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 117-56

(9) Grunenfelder L *et al.* (2006) *Postharv Biol Technol* 40, 73-81

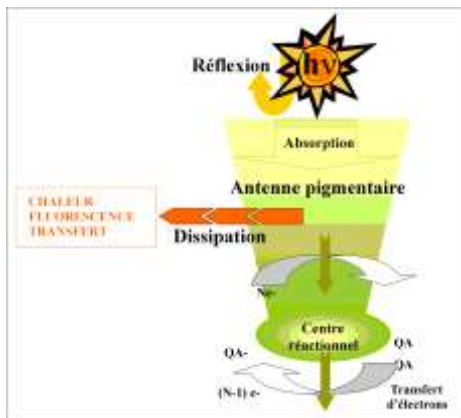


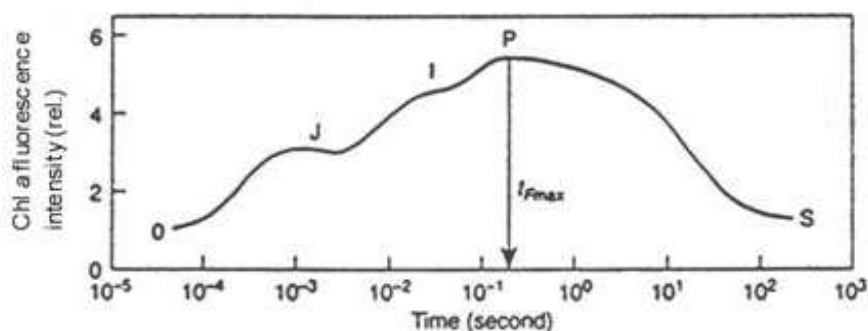
Figure 1 - Modèle des flux d'énergie des réactions photochimiques primaires au sein du photosystème II

L'antenne pigmentaire s'apparente à un entonnoir dans lequel l'énergie lumineuse est canalisée vers le centre réactionnel (chlorophylle piège), induisant la séparation de charge entre les accepteurs primaire et secondaire (quinone) d'électrons. Le transfert d'électrons est alors enclenché.

QA : quinone

© M. EYLETTERS

Figure 2 - Courbe typique d'émission de fluorescence d'un échantillon photosynthétique in vivo : l'effet Kautsky

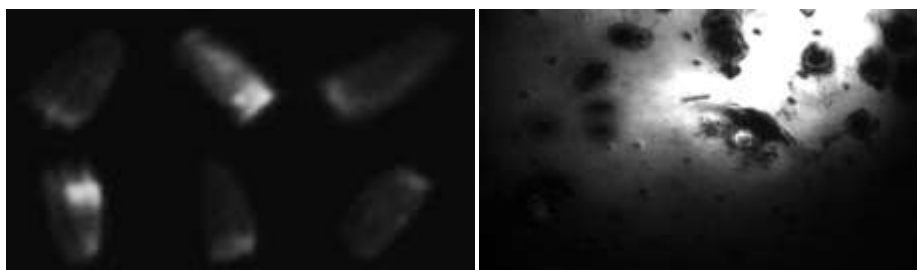


Les JIP-tests reposent sur l'analyse de la cinétique de fluorescence et en exploitent les points remarquables : O correspond à l'intensité de fluorescence minimale, J et I sont des points d'inflexion, P indique la fluorescence maximale et S le point de repos (*steady state*). TF max est le temps nécessaire pour obtenir le maximum de fluorescence, c'est le

moment à partir duquel s'enclenche la photosynthèse. D'après (2).

© DR

Figure 3 :



L'imagerie fluorescente permet de détecter et de localiser la chlorophylle de façon plus efficace que l'imagerie classique, tant dans des semences de chicorée (A) que sur des tubercules de pomme de terre (B). Ces images monochromes ont été prises dans une chambre noire à l'aide d'une caméra CCD à travers un filtre optique ne laissant passer que le proche infrarouge au-delà de 665 nm. Les objets ont été illuminés par une lumière monochromatique autour de 410 nm. Les zones les plus claires correspondent à la présence de chlorophylle a.

© D. OOMS



Mesure de fluorescence chlorophyllienne in vivo sur feuille de laurier cerise (*Prunus lauracerasus*) grâce à l'appareil Handy-Pea (Hansatech).

© M. EYLETTERS