

Synthèse bibliographique

1. Le tabac: présentation de la plante, origine et histoire

Le tabac était cultivé par les indiens, il y a plus de 3000 ans, avant la découverte du continent américain par Christophe Colomb en 1492. Les Amérindiens (Indiens d'Amérique) et les habitants de l'Amérique centrale sont les premiers peuples qui ont cultivé le tabac alors utilisé comme une plante sacrée et curative.

Le tabac a été importé d'abord en Espagne, dès 1518, comme une plante curative et ornementale. En France, c'est le prêtre André Thevet qui l'a importé *via* le Brésil en 1555.

Grâce à Jean Nicot l'ambassadeur de France au Portugal, le tabac triomphe en France. Monsieur Nicot cultiva du tabac (*Nicotiana rustica* L.) dans son jardin dès 1561 et persuadé de l'effet curatif de la plante, il envoya de la poudre de tabac à la Reine Catherine de Médicis afin de traiter les migraines de son fils François II. Le traitement eu du succès, et le tabac devint "l'herbe à la Reine" et son commerce sous forme de poudre fut réservé aux apothicaires.

Le nom du genre *Nicotiana* fut crée en 1565 en l'honneur de Jean Nicot, alors que le nom d'espèce *Tabacum* vient du mot Tobacco, c'est à dire "pipe" dans la langue des Amérindiens.

Le tabac est un genre de la famille des Solanacées comme la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) ou le poivron (*Capsicum annuum* L.). Ce genre "*Nicotiana*" comprend environ 70 espèces différentes, deux espèces uniquement ont une importance industrielle: *Nicotiana tabacum* L., et *Nicotiana rustica* L. Le genre *Nicotiana* a été classifié en 3 sous-genres *Tabacum*, *Rustica* et *Pétunioides* (Goodspeed et al., 1954) en s'appuyant sur leurs caractères morphologiques, leur répartition géographique, leurs caractères cytologiques et le comportement des chromosomes chez les hybrides interspécifiques des espèces. Knapp et al. (2004) a produit une nouvelle classification du genre *Nicotiana*, basée sur la classification de Goodspeed en fonction d'études récentes des génomes nucléaires et plastidiques de ces espèces (Figure 1).

Les plantes des sous-genres *Rustica* sont des herbes vigoureuses à feuilles pétiolées, et ses fleurs ont une couleur verte ou jaune.

Les plantes des *Pétunioides* sont aussi des herbes à feuilles pétiolées ou sessiles, disposées en rosette à la base de la tige. Ses fleurs ont une couleur blanche.

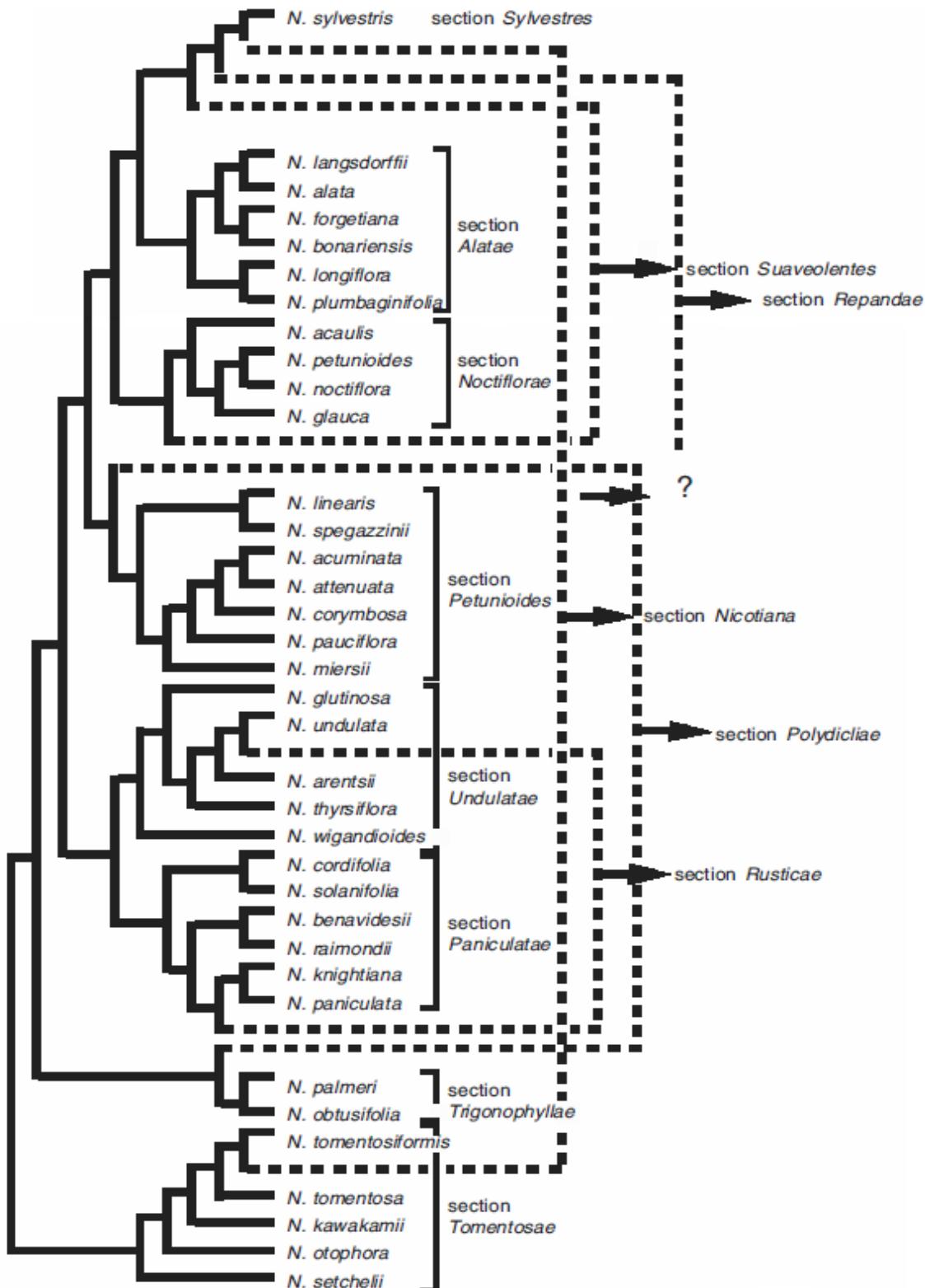


Figure 1. Représentation schématique de la classification du genre *Nicotiana* (d'après Knapp et al., 2004).

Le sous-genre *Tabacum* comprend des plantes vigoureuses, herbacées ou subarborescentes, à feuilles de grande taille et sessiles. La couleur du limbe varie du blanc au pourpre. Toutes les espèces sont d'origine sud-américaine, d'Argentine et du Pérou.

L'espèce *Nicotiana tabacum* L., du sous-genre *Tabacum* est la plus cultivée, elle vient en première place pour la production de tabac dans le monde, suivie de la culture de l'espèce *Nicotiana rustica* L.

2. Les herbicides

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture. Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux.

Ces produits se composent de deux types de constituants: les substances actives qui assurent l'activité phytosanitaire comme herbicide et les substances chimiques ou formulants qui complètent la formulation. Les formulants sont soit des charges ou des solvants qui n'ont qu'un rôle de dilution des matières actives, soit des produits qui améliorent la préparation.

Il existe aujourd'hui de nombreux herbicides à la disposition des agriculteurs, classifiés la plupart du temps selon le mode d'action de la substance active. Le mode d'action d'un herbicide comprend tous les phénomènes qui induisent la destruction d'une plante sensible. Les herbicides se distinguent donc par leur voie de pénétration dans le végétal, leur déplacement vers le site d'action, et enfin leur action sur les différents processus de croissance et de développement des plantes. Ces effets se traduisent par des désordres dans le fonctionnement physiologique de la plante qui peuvent être des perturbations de la photosynthèse, de la division cellulaire ou encore de la biosynthèse des constituants cellulaires, acides aminés ou pigments photosynthétiques.

La plupart des herbicides utilisés dans l'agriculture limitent le fonctionnement du chloroplaste. En effet, les inhibiteurs des réactions de la photosynthèse représentent plus de la moitié de tous les herbicides disponibles dans le commerce depuis les 50 dernières années et le clomazone fait partie de cette catégorie d'herbicides dont le site d'action est le chloroplaste.

Le clomazone: exploitation et mode d'action

Le clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthyl-1,2-oxazolidin-3-one] est une substance active qui appartient à la famille chimique des isoxazolidines ([Figure 2A](#)). Cet herbicide de pré-émergence est utilisé contre les mauvaises herbes à feuilles larges et les graminées ([Warfield et al., 1985](#)) dans les champs de soja, coton, canne à sucre, maïs, riz et tabac ([Chang](#)

et al., 1997). La demie vie du clomazone dans le sol est de 5 à 120 jours (Cumming et al., 2002).

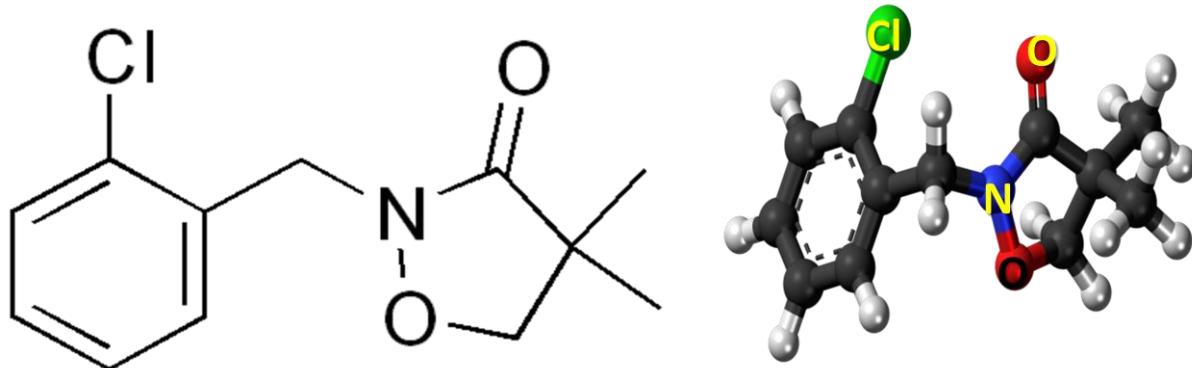
Le clomazone est absorbé par les racines, puis transporté jusqu'aux feuilles avec le flux de transpiration *via* le xylème (Senseman 2007). Il est généralement admis que le clomazone inhibe la biosynthèse des caroténoïdes, ce qui induit un blanchiment (apparence jaune ou vert pâle des feuilles des plantules), variable selon les espèces et/ou la méthode et la dose de traitement (Duke and Kenyon, 1986). Il a été montré également que le clomazone est un herbicide plus ou moins sélectif (Weimer et al., 1992). La toxicité du clomazone et son effet sur la diminution de la biosynthèse des caroténoïdes est due à son produit de dégradation 5-keto-clomazone qui inhibe l'enzyme DXS responsable de la synthèse de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP), la première voie de la synthèse d'enzyme isopentényl diphosphate plastidique (IPP) (Ferhatoglu and Barrett, 2006) (Figure 2B).

La plupart des études réalisées sur l'effet du clomazone ont été effectuées en utilisant de fortes concentrations de clomazone. Ces études ont attribué la toxicité du clomazone à son effet d'inhibition du fonctionnement l'enzyme DXS, et par conséquent à la diminution de la biosynthèse des pigments photosynthétiques. Certains travaux ont cependant montré que le clomazone n'a pas d'effet sur l'activité de l'hydroxy-méthylglutaryl reductase (HMGR), enzyme synthétisant l'acide mévalonique précurseur de la synthèse de l'isopentényle pyrophosphate (IPP) (Ji and Hatzios, 1990). Lutzow et al. (1990) ont démontré que l'effet de blanchiment des feuilles n'était pas lié à l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes. De plus, les résultats de Weimer et al. (1992) montrent que le clomazone n'a aucun effet sur la synthèse du géranylgeranyle pyrophosphate (GGPP) *via* la voie du mévalonate (la voie cytoplasmique). Bien que le clomazone limite la biosynthèse des caroténoïdes *via* l'inhibition de l'enzyme DXS dans la voie plastidique, la biosynthèse des caroténoïdes *via* la voie cytoplasmique est possible. Il est nécessaire donc d'indiquer que l'effet du clomazone ne peut pas être résumé à son impact sur l'activité du DXS et la biosynthèse des pigments photosynthétiques, d'autres effets sont également probables. Récemment, l'étude de Yasuor et al. (2010) a indiqué que le mécanisme de tolérance au clomazone est multifactoriel, le niveau du métabolisme oxydatif et l'atténuation des dommages photoxydantes étant des facteurs essentiels de tolérance au clomazone chez *Echinochloa phyllospogon*.

Cependant, la bibliographie sur l'effet photooxydatif du clomazone est très peu abondante. Il a été rapporté chez *Hordeum vulgare* L., que l'activité du PSII et le transport des électrons n'est pas affecté totalement par le clomazone (Kaňa et al., 2004). Chez *Emilia coccinea* L., le clomazone en combinaison avec d'autres herbicides a induit un stress oxydatif après 72 h

d'application (Souza et al., 2012). Il semble donc que le clomazone altère plus ou moins directement le fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques.

(A)



(B)

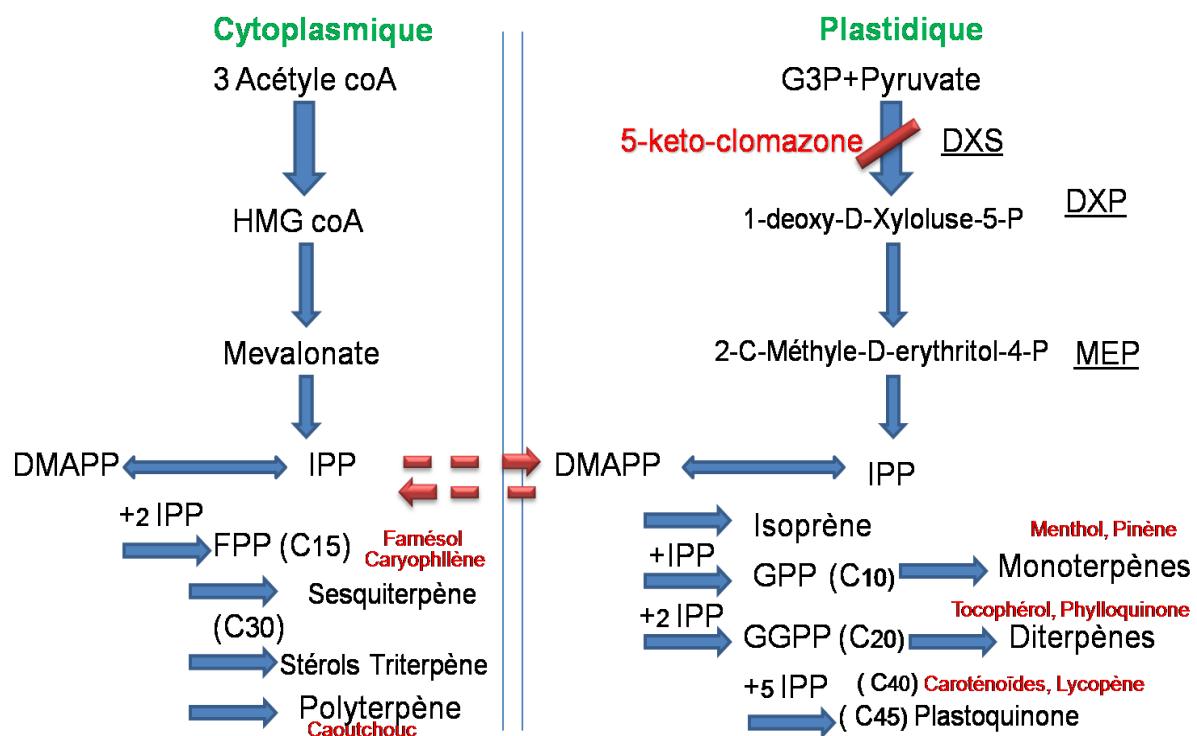
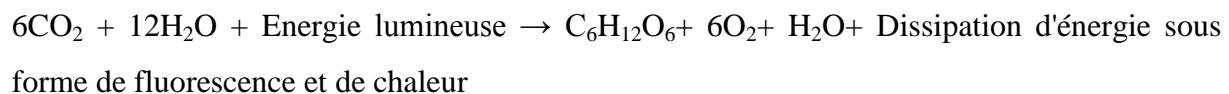


Fig.2. A, Structure du [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthyl-1,2-oxazolidin-3-one]; B, Représentation schématique des voies cytoplasmique et plastidique de la synthèse des isoprénoïdes. Le clomazone inhibe la synthèse de l'enzyme DXS (d'après Ferhatoglu and Barrett, 2006).

3. Action des herbicides sur le fonctionnement photosynthétique

3.1. Rappels sur les réactions photochimiques de la photosynthèse

La photosynthèse est un processus par lequel l'énergie solaire est convertit en énergie électrochimique essentielle pour les réactions d'oxydo-réduction (redox). Ce processus s'accompagne d'un dégagement d'oxygène par oxydation de l'eau, ce qui permet la réduction du dioxyde de carbone et la synthèse des glucides selon la réaction suivante:



Ces réactions ont lieu dans le chloroplaste, organite présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes photosynthétiques (plantes, algues). Le chloroplaste a deux membranes (interne et externe) bordant une zone aqueuse appelée stroma (Figure 3.1.A) qui contient la membrane thylacoïdale et les complexes de pigments-protéines effectuant les réactions photochimiques de la photosynthèse (Dekker and Boekema, 2005).

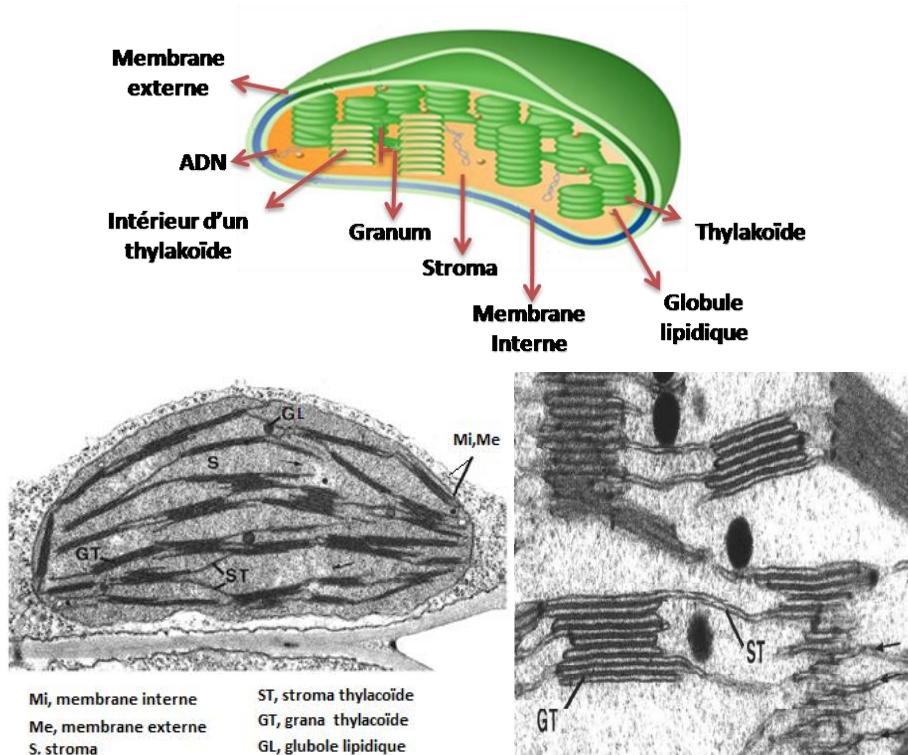


Figure 3.1.A. Structure schématique et micrographie électronique d'un chloroplaste d'un jeune plant de tabac (d'après Staehelin 2003).

L'espace interne enclos par la membrane thylacoïdale est le lumen. Dans les membranes du thylacoïde existent différents complexes de pigments-protéines impliqués dans l'absorption de l'énergie lumineuse, les réactions photochimiques et le transport des électrons photosynthétiques (Malkin and Niyogi, 2000; Dekker and Boekema, 2005) (Figure 3.1.B).

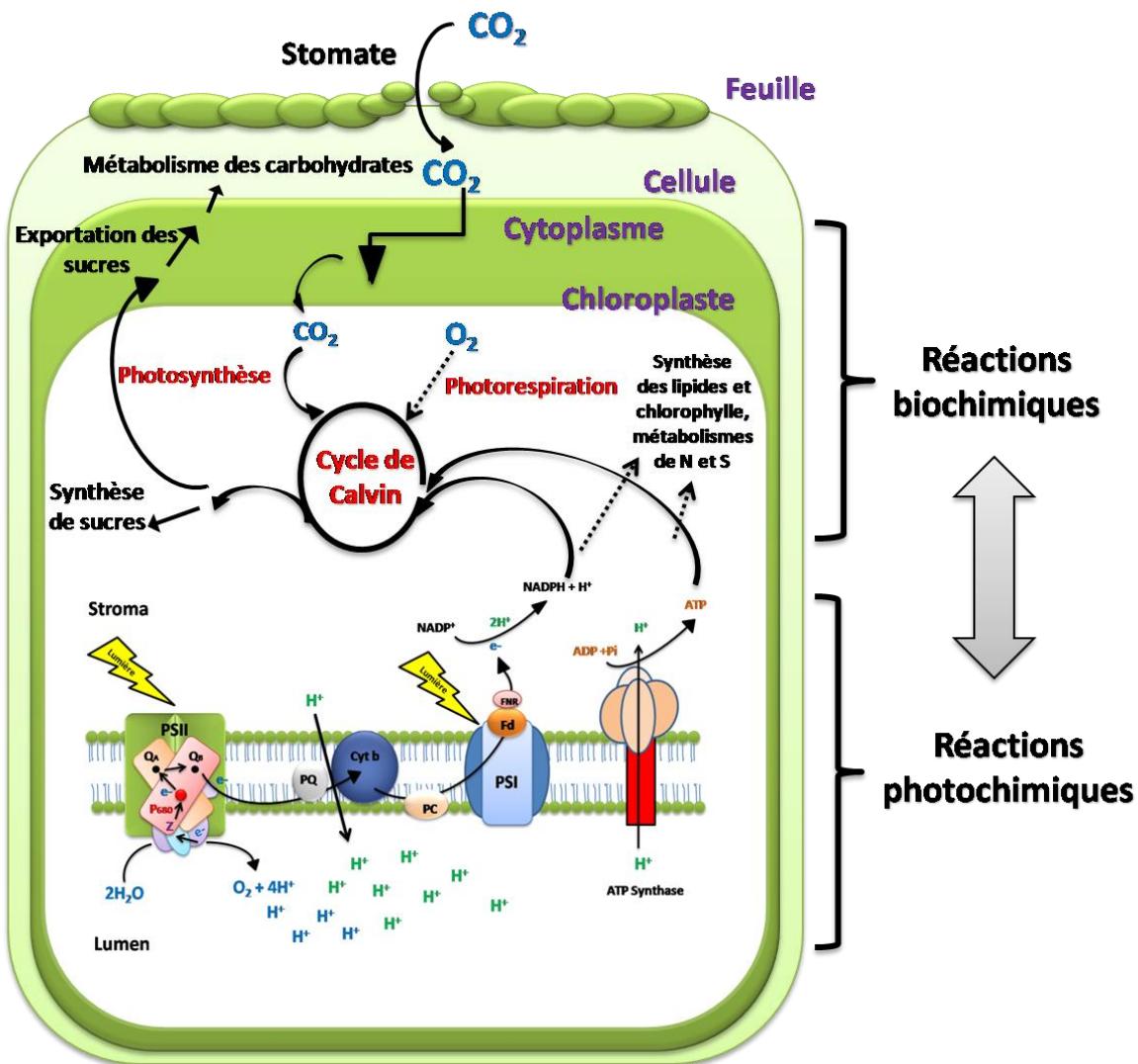


Figure 3.1.B. Représentation schématique des réactions photochimiques de la photosynthèse et des réactions biochimiques dans le chloroplaste (d'après Baker and Rosenqvist, 2004).

3.1.1. La structure du photosystème II (PSII)

Le PSII est constitué selon la structure la plus récente (Guskov et al., 2009) de 20 sous unités peptidiques et d'un grand nombre de complexes pigments-protéines ("35 chlorophylles, 12 caroténoïdes", des complexes métallo-protéique "2 molécules de phéophytines, un atome de

fer, 2 ions calcium, dont un contenu dans le cluster de manganèse, 4 manganèse (le cluster Mn_4Ca), 2-3 quinones Q_A et Q_B , 2 hèmes et 25 lipides) (Szabo et al., 2005).

3.1.1.1. Le centre réactionnel

Le centre réactionnel du PSII est un complexe protéique composé de deux protéines-cœur, D1 et D2 de 32-34 kDa qui sont parfois nommées *PsbA* et *PsbD*, du nom de leurs gènes respectifs. Les protéines D1 et D2 renferment six chlorophylles a et deux phytines, associées à des protéines; en outre, deux plastoquinones sont présentes dans des préparations retenant une partie de l'antenne interne (Figure 3.1.1.1). Un atome de fer lié aux protéines D1 et D2 est situé dans l'environnement de deux quinones. D1 et D2 lient la paire spéciale, donneur primaire d'électrons, et deux chaînes de deux composés redox en position systématique sur D1 et D2. En effet, six chlorophylles exactement appartiennent au centre réactionnel (d'après Zouni et al., 2001). Deux chlorophylles associées en une paire dite "spéciale" constituent le donneur primaire de charges, le P680. Deux autres sont des molécules accessoires dont le rôle est incertain, nommées ChlD1 et ChlD2 comparables aux chlorophylles A et A' du PSI. La cinquième et la sixième chlorophylle assureraient chacune une liaison avec les protéines CP43 et CP47 de l'antenne interne, elles sont appelées aussi ChlzD1 et ChlzD2. Ces deux dernières chlorophylles peuvent intervenir dans le transfert de l'énergie lumineuse en provenance de l'antenne interne vers la paire spéciale *via* les chlorophylles ChlD1 et ChlD2. Le centre réactionnel présente au moins sept molécules de β -carotène (Ferreria et al., 2004) jouant un rôle protecteur vis-à-vis des molécules chlorophylliennes (Kamiya and Shen, 2003).

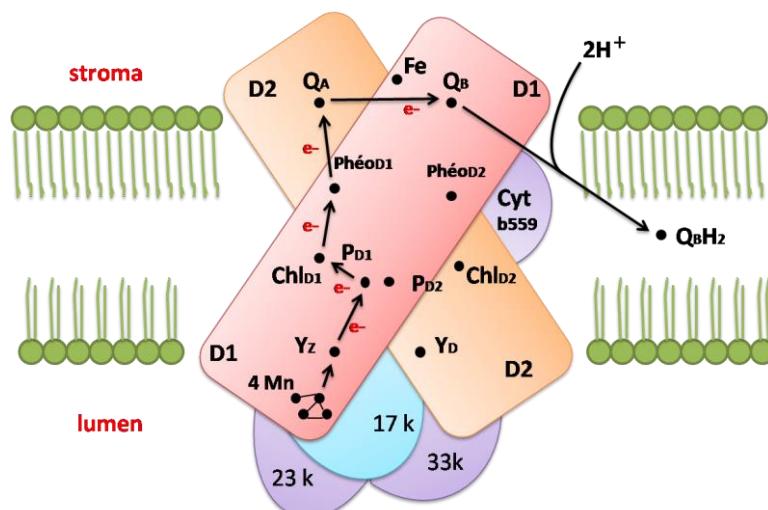


Figure 3.1.1.1. Représentation schématique du centre réactionnel du photosystème II.

3.1.1.2. Les antennes collectrices de lumière du Photosystème II (PSII)

Les antennes collectrices de la lumière du PSII sont constituées de deux complexes: l'antenne périphérique et l'antenne interne. L'antenne périphérique est constituée de complexes pigments-protéines LHCII (Light Harvesting Complex II) qui sont l'antenne majeure du PSII, et l'antenne complexe mineure du PSII, CP29, CP26 et CP24.

Le complexe LHCII est formé de protéines de 24 à 29 kDa qui lient la Chl *a* et la Chl *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme les xanthophylles lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine ([Sandona et al., 1998](#); [Van Amerongen and Dekker, 2003](#)). Le complexe LHCII contient entre 50 à 65 % de la quantité totale de la Chl (*a* et *b*) et environ 30 % des protéines de la membrane des thylakoïde ([Thomber et al., 1991](#)).

Les complexes pigments protéines de l'antenne mineure, CP29, CP26 et CP24 sont moins riches en Chls par rapport aux LHCII; ils comprennent 5 à 20 % de la chlorophylle totale du PSII ([Barber and Kuhlbrant, 1999](#)), mais plus riches en xanthophylles. Les complexes CP29 et CP26 sont attachés au centre réactionnel (CR) tandis que le CP24 est associé aux LHCII. La position périphérique de cette antenne autour LHCII permet de transférer l'énergie d'excitation du LHCII au CR *via* les antennes internes.

L'antenne interne est constituée de deux protéines dites CP47 et CP43, codées par les gènes chloroplastiques *psbB* et *psbC* respectivement. CP47 et CP43 se lient à 16 et 14 molécules de la chlorophylle *a* respectivement et à une dizaine de molécules de β-carotène ([Ferreira et al., 2004](#)). CP47 et CP43 ont la fonction de LHCII; elles absorbent la lumière et permettent de transférer l'énergie d'excitation au CR ([Bricker and Frankel, 2002](#); [Van Amerongen and Dekker, 2003](#)).

3.1.1.3. Le complexe de la photolyse de l'eau

L'oxydation de l'eau est assurée par un système enzymatique complexe (CEO) effectuant la photolyse de l'eau. CEO est composé d'un "cluster" de manganèse (Mn₄Ca) et de trois protéines extrinsèques. Ce sont des protéines hydrophiles de poids moléculaire de 33, 23, et 17 kDa, codé par les gènes nucléaires *psbO*, *psbP*, *psbQ*, respectivement. Ces trois protéines sont importantes pour maintenir le fonctionnement et à la stabilité de PSII. La protéine de 33 kDa contribue à la stabilisation du "cluster" de manganèse et la liaison des ions Cl⁻ et Ca²⁺. En plus, cette protéine maintient la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa, en conséquence la capacité du complexe PSII pour qu'il soit en état fonctionnel. La protéine de 23 kDa permet de maintenir la structure et le fonctionnement du CEO en fixant les atomes

Ca^{+2} et Cl^{-} pour la réaction de protolyse (Roose et al., 2007). La protéine de 17 kDa permet de stabiliser le CEO en fixant l'ion Ca^{+2} (Barra et al., 2005).

3.1.2. Structure et fonctionnement du photosystème I (PSI)

Le PSI est constitué d'un complexe antennaire externe et d'une antenne interne entourant le centre réactionnel (CR). Les antennes externes LHCl-680 et LHCl-730 sont composées de quatre sous-unités protéiques associées en dimères LHCA1-LHCA4. Deux protéines hydrophobes *psaA* et *psaB* participent à la construction du CR du PSI, qui contient aussi une paire de Chl *a* appelée P700. Trois autres protéines extrinsèques C, D et E, codées par les gènes chloroplastiques *psaC*, *psaD* et *psaE* sont en liaison avec les deux protéines *psaA* et *psaB* et sont impliquées dans le transfert d'électrons du PSI à la ferrédoxine (Fd) (Figure 3.1.2).

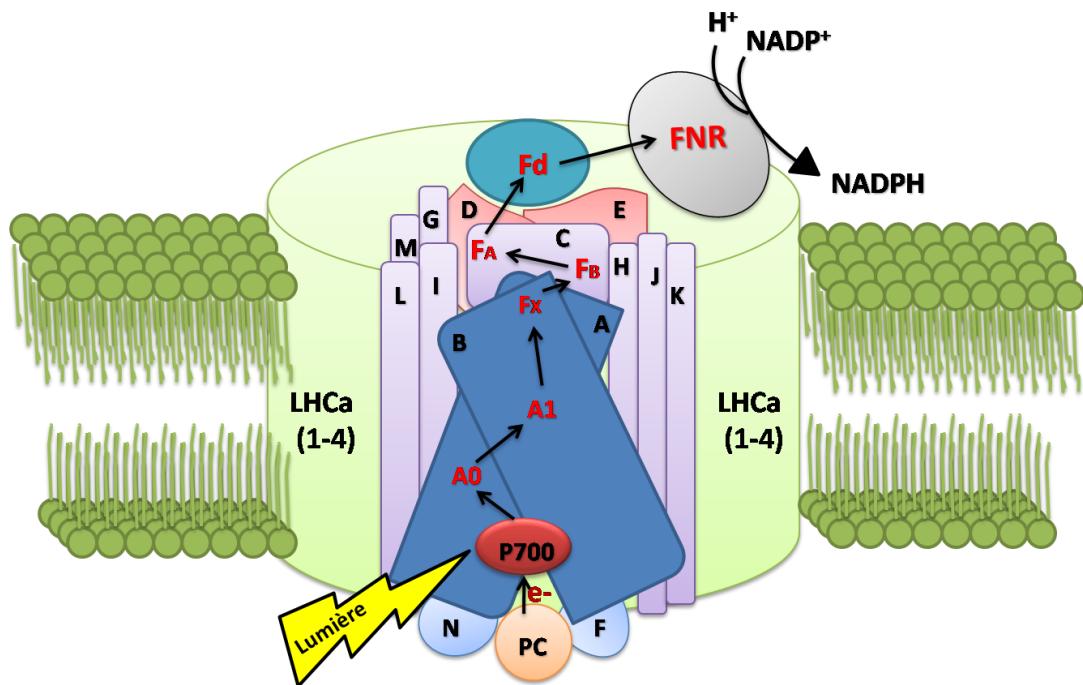


Figure 3.1.2. Représentation schématique du photosystème I (PSI) montrant l'organisation de ses différentes composantes protéiques (d'après Joly 2007).

3.1.3. Fonctionnement de la chaîne de transport des électrons

3.1.3.1. Transport linéaire d'électrons

Lorsque les molécules de chlorophylles des antennes collectrices absorbent un photon, elles changent de niveau d'énergie et passe à l'état excité (1chl*). La dissipation de cette énergie se fait en partie sous forme de chaleur et sous forme de fluorescence. Une autre partie est transférée par résonance de façon aléatoire, d'un pigment à l'autre, jusqu'aux molécules de chlorophylle *a* du centre réactionnel. Le transfert des électrons commence effectivement lorsque l'énergie d'excitation arrive à une paire spéciale de Chl *a* du PSII, P680, qui passe à l'état excité P680*. En conséquence de ce processus d'excitation, P680* perd son électron excité. L'électron perdu est reçu par une molécule de phéophytine considérée comme l'accepteur primaire d'électrons. La phéophytine est une forme de chlorophylle *a* dans laquelle l'ion magnésium a été remplacé par deux atomes d'hydrogène. Ce transfert d'électron va créer une charge positive au centre réactionnel du PSII, ce qui entraîne la formation de P680⁺. P680⁺ recevra ensuite un électron du résidu tyrosine Z qui est le donneur primaire du PSII. Cet électron provient de la réaction de photolyse de l'eau, catalysée par le complexe Mn₄Ca. La phéophytine transfère ensuite un électron à une molécule de PQ appelée (Q_A). Le centre réactionnel peut être considéré comme "fermé", c'est à dire, qu'il est incapable de subir un autre évènement d'oxydoréduction. Ensuite, l'électron passe de Q_A à Q_B qui se lie d'une manière transitoire avec la plastoquinone (PQ) située sur le côté stromal de la protéine D1 du centre réactionnel. La réduction de la PQ associée au site Q_B nécessite deux électrons provenant de Q_A et Q_B. Pendant deux réactions d'oxydoréductions successives, la PQ capte deux protons du stroma. La plastoquinone réduite (PQH₂) a une faible affinité pour son site (site Q_B) de liaison avec la protéine D1. PQH₂ se détache ainsi du site Q_B et diffuse dans la membrane des thylacoïdes. Par la suite, les molécules PQH₂ réduisent les cytochromes *b6f* en libérant deux protons dans le lumen du thylacoïde. Cette réaction participe à la formation d'un gradient de protons responsable de la synthèse de l'ATP. Les électrons reçus par les cytochromes *b6f* sont ensuite transférés à la plastocyanine (PC), puis au P700⁺ du PSI. L'accepteur primaire d'électrons dans le PSI est une Chl (A₀), qui transfère l'électron sur une molécule de phylloquinone (A₁). Ensuite, l'électron sera transféré tour à tour sur une série de trois complexes fer-soufre (Fe₄S₄), F_X, F_A, et F_B. F_B qui réduira un transporteur protéique soluble, Fd, qui lui-même va réduire le NADP⁺ en NADPH dans une réaction catalysée par l'enzyme FNR. Ces transporteurs d'électrons et protons sont organisés selon un schéma

thermodynamique indiqué par Z , qui dépend de leur potentiel d'oxydoréduction (Figure 3.1.3).

3.1.3.2. Transport cyclique d'électrons

En cas de stress physiologique, le transfert d'électrons linéaire induit par les réactions photochimiques est réduit. Le NADP^+ , utilisé comme accepteur terminal d'électrons, devient peu disponible, ce qui conduit au transfert d'électrons accumulés au niveau de PSI à l'oxygène et la génération des ERO. L'appareil photosynthétique cependant effectue un transport cyclique des électrons dépendants ne reposant que sur la réaction du PSI (Golding and Johnson, 2003; Johnson 2011). Ce transfert décrit un recyclage des électrons depuis les accepteurs terminaux du PSI sous leur forme réduite, le pool de NADPH et la ferredoxine (Fd), jusqu'à une entrée au sein du complexe plastoquinone-cytochrome b_6f dans la voie linéaire d'électrons. Cela contribue à une augmentation du gradient de protons dans le lumen du thylacoïde ainsi qu'à la synthèse d'ATP sans une nouvelle production de NADPH (Figure 3.1.3). Bien que particulièrement stimulé en cas de stress, le transport cyclique des électrons coexiste, en conditions non stressantes, avec le transport linéaire.

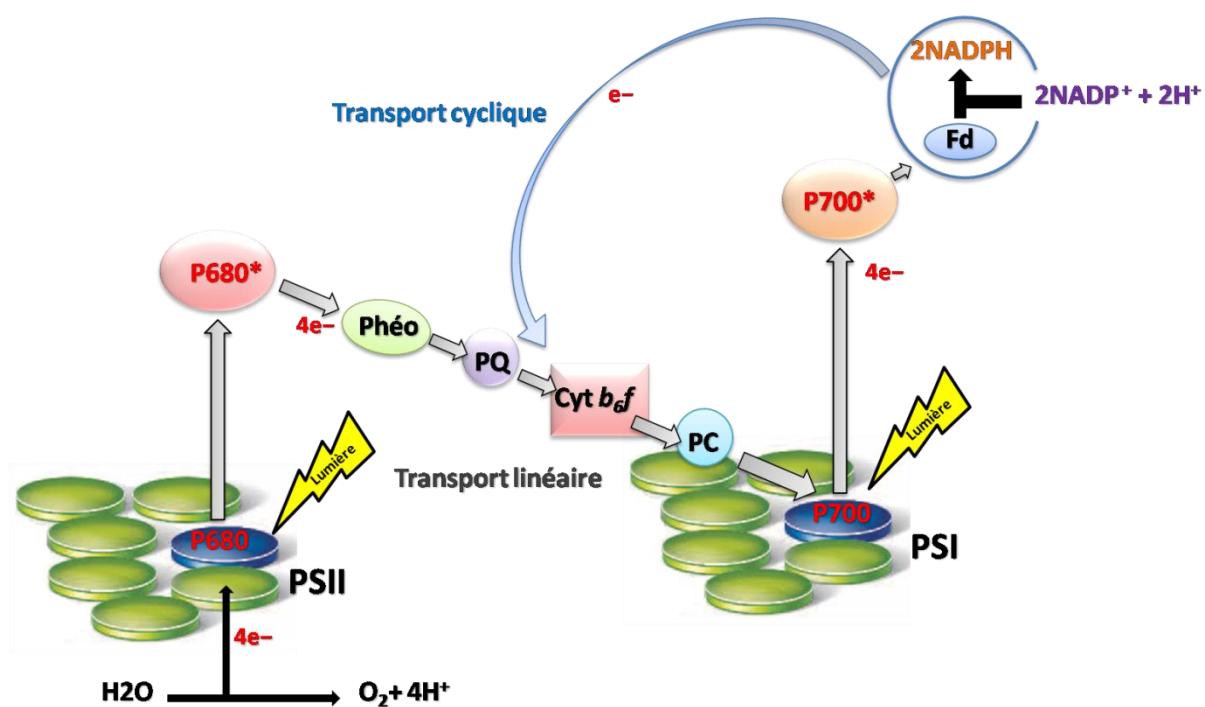


Figure 3.1.3. Représentation schématique du transport linéaire et cyclique d'électrons dans la membrane de thylacoïde.

3.2. Effet des herbicides sur le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons

L'inhibition de la photosynthèse par les herbicides est attribuée à leur action au niveau de la chaîne de transport des électrons. Les diminutions de la fixation de CO₂ et de l'accumulation de biomasse sont des conséquences des perturbations de la chaîne de transport des électrons. À ce jour, et à ma connaissance, aucune étude n'a décrit de perturbation par les herbicides du fonctionnement du cycle Calvin.

En cas de stress, les électrons, dans l'état singulet excité de la chlorophylle, peuvent changer l'orientation de leur spin, ce qui induit la formation de la chlorophylle à l'état triplet (3Chl*). 3Chl* peut se maintenir sur cette forme et est capable de convertir l'oxygène à l'état triplet (³O₂) ou singulet (¹O₂). Ces réactions sont à l'origine du stress photooxydatif ([Rutherford and Krieger-Liszakay, 2001](#)). Il a été rapporté que ¹O₂ pouvait initier le blanchiment de la chlorophylle par une dégradation de la réticulation des protéines ([Šetlík et al., 1990](#)). Cette situation de stress est considérée comme un mode d'action de plusieurs herbicides, particulièrement ceux chez qui la toxicité n'apparaît qu'en présence de lumière ([Bowyer et al., 1991](#)).

En général, la majorité des herbicides ont leur site d'action au niveau du PSII, et en particulier au niveau du site accepteur des électrons. En conséquence, le dégagement de l'oxygène du complexe oxydé de l'eau diminue et, la photolyse de l'eau est inhibée.

Certains herbicides (par exemple le paraquat) fonctionnent au niveau du PSI comme accepteurs des électrons, ce qui induit ainsi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) lorsqu'ils transfèrent leurs électrons à l'oxygène.

Les herbicides de type phénolique modifient les propriétés thermodynamiques de la quinone A (Q_A), ce qui entraîne une augmentation de l'énergie disponible pour la réaction de recombinaison de charges. Ces herbicides sont connus pour se lier au site de la quinone échangeable (Q_B) dans le centre du photosystème II (PSII). Par conséquent, le transfert des électrons est bloqué ce qui induit une diminution de l'activité de la photosynthèse. Cependant, cette toxicité induite par l'herbicide semble aggravée en présence de lumière *via* la génération de ¹O₂. Plus clairement, l'énergie n'est pas utilisée pour le transfert d'électrons photosynthétiques, les chances de former 3Chl* sont augmentées, cela conduit à la formation de ¹O₂ dans le cœur du centre réactionnel du PSII, et endommage les complexes pigments-protéines.

Les herbicides de type phénylurés et les triazines vont bloquer l'oxydation de Q_A⁻ en se liant au site Q_B, empêchant son association avec la plastoquinone. Ce qui inhibe la chaîne de

transport d'électrons dans les chloroplastes, et induit de la même manière une concentration cellulaire en ERO élevée. Les plantes montrent alors des symptômes de stress photooxydatif et des dysfonctionnements cellulaires. D'une part, les ERO peuvent arracher des électrons aux molécules organiques, détruisant des composants de la cellule tels que les pigments photosynthétiques et engendrer des dommages oxydants en cascade en dégradant les lipides membranaires, les protéines et l'ADN (Halliwell 2006). D'autre part, les ERO induisent une inhibition de la synthèse de la protéine D1, ce qui favorise l'inhibition des mécanismes de réparation du PSII (Nishiyama et al., 2006), et se traduit par un blocage du fonctionnement du système enzymatique de photolyse de l'eau (Song et al., 2006).

Quelques herbicides sont capables d'inhiber la synthèse du complexe LHCII soit par:

- l'inhibition de l'activité de l'enzyme protochlorophyllide reductase (par exemple l'atrazine) et par conséquent la diminution de la synthèse de chlorophylle (Gonzalez-Barreiro et al., 2004).
- la perturbation de la synthèse de la chlorophylle-protéine complexe dans le complexe LHCII de PSII (par exemple le flazasulfuron) (Frankart et al., 2003).
- l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes (par exemple le norflurazone) par inactivation de l'enzyme phytoène désaturase. Les caroténoïdes, en association avec les tocophérols, peuvent éliminer $^1\text{O}_2$ directement, en ayant un effet de "quenching" de 3Chl* capable d'empêcher la formation de $^1\text{O}_2$ (Asada 2006). La diminution de leur teneur peut provoquer une photoinhibition, par conséquent un stress photooxydatif, et des altérations des complexes pigments-protéines du LHCII et du centre réactionnel du PSII sous illumination (Böger 1996; Kim et al., 1999; Tomlin 2000).
- l'inhibition de la synthèse de l'enzyme DXS le premier enzyme dans la voie du métabolisme plastidique du MEP (2-C-Méthyle-D-erythritol-4-P) (par exemple le clomazone) (Ferhatoglu and Barrett, 2006), ce qui induit une diminution des teneurs de chlorophylles et de caroténoïdes.

En conclusion, l'inhibition de la chaîne de transport des électrons ou la réduction de la synthèse de pigments, conduit à la formation d'espèces réactive de l'oxygène (ERO); l'effet des herbicides est donc majoritairement un effet stress oxydatif.

4. Mécanismes impliqués dans la protection des plantes contre le stress oxydatif

Bien que le chloroplaste soit considéré comme le principal organite source de formation des ERO, il existe de nombreuses autres sources. Dans la mitochondrie, les xénobiotiques induisent la formation des ERO *via* la respiration. La photorespiration et la réaction de Mehler

sont source de production des ERO et sont également impliquées dans les mécanismes de protection (Figure 4).

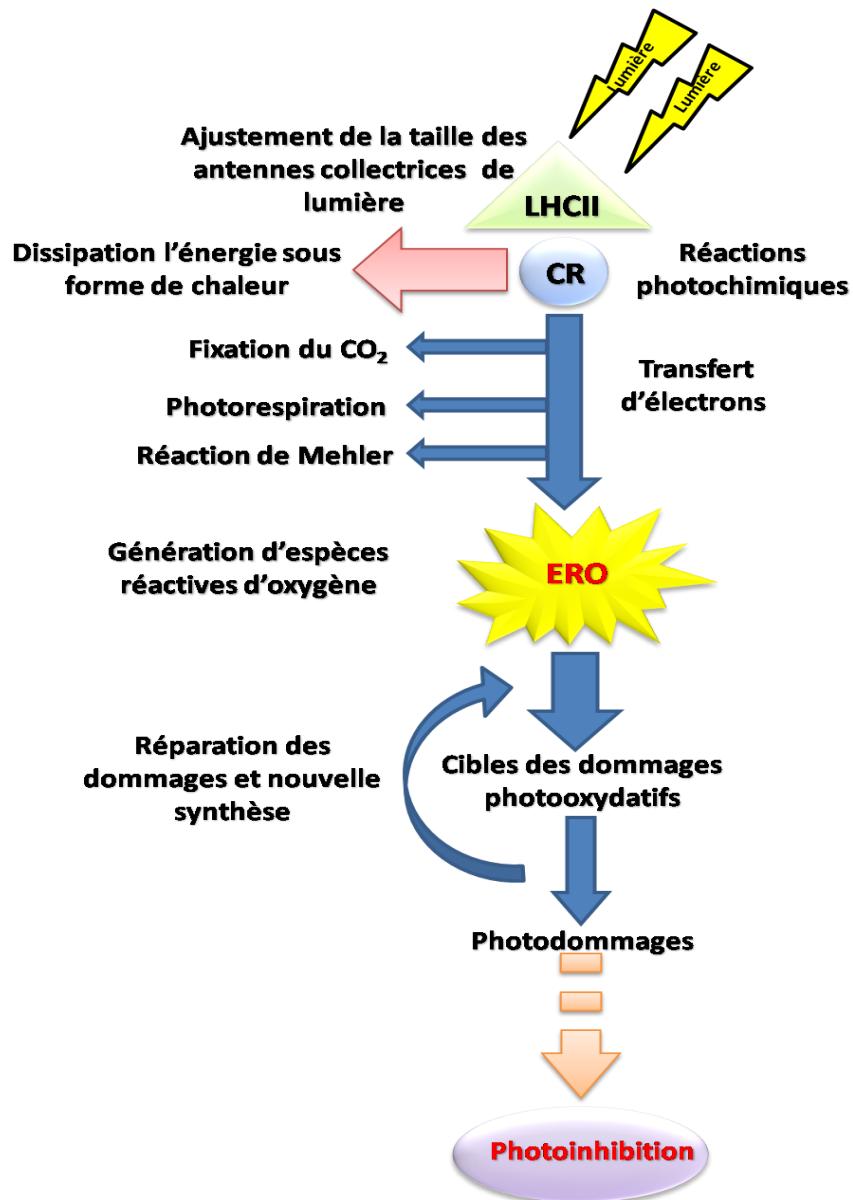


Figure 4. Représentation schématique des processus de la gestion d'énergie lumineuse lorsque le photosystème II subit d'un excès de l'énergie de l'excitation. CR: Centre réactionnel du PSII (d'après [Niyogi 1999](#)).

4.1. La dissipation d'énergie en chaleur

Les xanthophylles, associées avec les antennes (LHCII) du PSII, participent à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse selon une série de réactions appelées «cycle des xanthophylles» ([Demmig-Adams 1990](#)). Les xanthophylles participent effectivement à la protection de l'appareil photosynthétique en diminuant la durée de vie de la 1Ch* ([Horton et al., 1996](#)). Le

cycle des xanthophylles dépend de la formation du ΔpH via la membrane thylakoïdale, entraîne une protonation de LHCII et une activation d'une déépoxydase capable de convertir la violaxanthine de LHCII en zéaxanthine, ce qui induit un changement de conformation des antennes (Horton et al., 2005; Murchie and Niyogi, 2011; Takahashi and Badger, 2011).

4.2. Les phénomènes de transition d'état

La capacité des plantes à ajuster la taille des antennes collectrices de lumière (LHCs) par le processus de transition entre les états I et II des photosystèmes, conduit à une redistribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes, et une réduction de la capture des photons au niveau du PSII en fonction de leurs besoins. L'état I est obtenu quand la taille des antennes LHCII du PSII est augmentée. L'inverse se produit à l'état II, c'est-à-dire que les LHCII du PSII diminuent et celles du PSI s'agrandissent. Lorsque le PSII fonctionne plus vite que le PSI, il s'en suit une forte réduction du pool de PQ et une augmentation du rapport PQH_2/PQ , ce qui active les protéines kinases entraînant la phosphorylation des LHCII. La forme phosphorylée perd alors son affinité pour le PSII et s'en détache pour migrer vers le PSI (état II). Le retour des LHCII vers le PSII (l'état I) est initié par l'activation des phosphatases suite à l'oxydation du pool de PQ (Allen 2003). Ces arrangements permettent donc d'optimiser l'efficacité de la chaîne de transport d'électrons en fonction de la lumière reçue (Farineau and Morot-Gaudry, 2011).

4.3. La photorespiration

La photorespiration est un processus biochimique qui se passe, chez les plantes C3, lorsque la première enzyme dans la voie photosynthétique de la fixation de CO_2 , la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) fixe l' O_2 et non plus le CO_2 (Figure 4.3). La photorespiration tient son nom du fait que ce processus consomme de l' O_2 et aboutit à un rejet de CO_2 à la lumière. Les réactions biochimiques de la voie photorespiratoire impliquent une coordination étroite entre les métabolismes des chloroplastes, des mitochondries et des péroxyosomes, organites souvent proches les uns aux autres dans les cellules photosynthétiques des végétaux supérieurs. Dans les conditions d'augmentation de la température ou la diminution des concentrations intercellulaires de CO_2 lors de la conductance stomatique est faible, la Rubisco catalyse une réaction compétitive dans laquelle la molécule d' O_2 par rapport à celle de CO_2 est favorisée comme substrat. Dans des conditions atmosphériques ambiantes, à 25 °C, environ 30 % du flux total d'électrons est détourné vers l'oxygène (Ort and Baker,

2002). L'activité oxygenase de la rubisco a été proposée comme un mécanisme capable de protéger l'appareil photosynthétique contre les photodamages dus à un excès d'énergie lumineuse (Roland et al., 2006). En cas de photoinhibition, la photorespiration est considérée comme le dissipateur alternatif majeur des électrons, grâce essentiellement à ses activités métaboliques consommatrices d'ATP et de NADH+H⁺ et à l'existence de transporteur de malate et d'oxaloacétate entre les chloroplastes et les mitochondries.

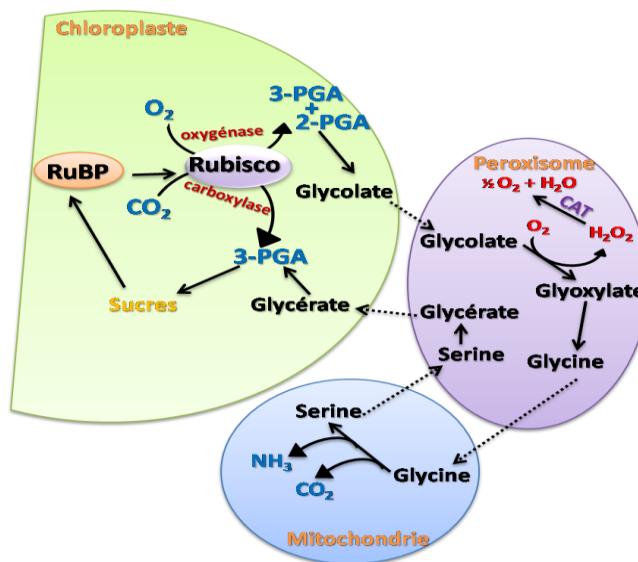


Figure 4.3. Représentation schématique de la voie photorespiratoire (d'après Busch 2012). CAT, catalase; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; NH₃, ammoniac; 3-PGA, 3-Phosphoglycolate; 2-PGA, 2-Phosphoglycolate; RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate; Rubisco, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase.

4.4. Le transport des électrons méta-cyclique

Des transporteurs présents dans les enveloppes des chloroplastes et des mitochondries peuvent échanger et transporter du malate et de l'oxaloacétate, ce qui est appelé Malate Shuttle (Scheibe 1987). La production de malate à partir de l'oxaloacétate en malate dans le chloroplaste consomme du NADPH issu de l'activité photosynthétique. Le malate exporté vers la mitochondrie peut être réoxydé en OAA et le NADH produit utilisé par la respiration.

4.5. La réaction de Mehler

La réaction de Mehler décrit un transfert des électrons entre la Fd, un des complexes Fe-S liés au PSI et l'oxygène.

Cette réaction est stimulée lorsque la forme réduite du NADP est limitante et l'énergie lumineuse d'excitation élevée. La réaction de Mehler produit des ions superoxydes O_2^- rapidement convertis en H_2O_2 par les superoxydes dismutases (SOD) (Mehler 1951).

La détoxification de H_2O_2 a lieu *via* l'ascorbate peroxydase qui réduit le H_2O_2 au H_2O en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électron (Nakano and Asada, 1980). La production de monodéhydroascorbate (MDHA) puis d'ascorbate *via* la monodéhydroascorbate reductase (MDHAR) aboutit à la production de H_2O . Cette voie permet d'atténuer la photoinhibition du PSII en fonctionnant comme un récepteur d'électrons, ce qui améliore la séparation des charges au niveau de centre réactionnel du PSII, P680, et empêche la formation de 3Chl* et en conséquence la génération d' 1O_2 (Park et al., 1996) (Figure 4.5).

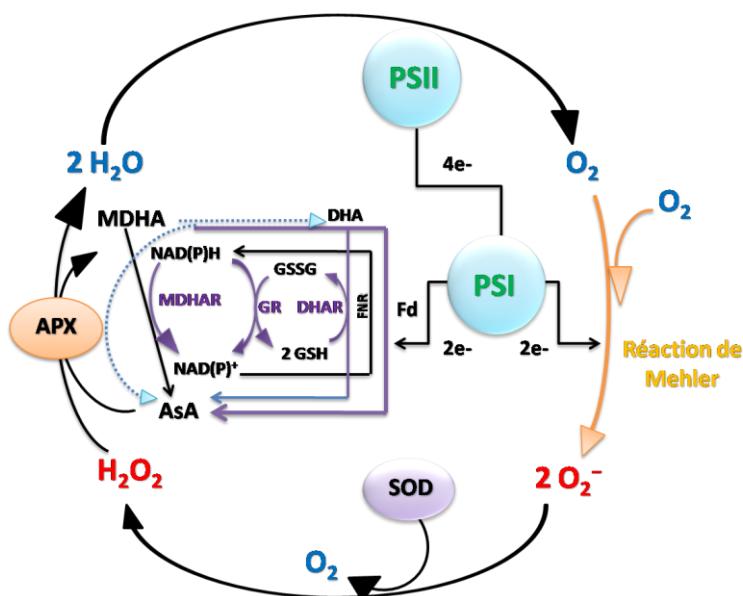


Figure 4.5. Représentation schématique des réactions de la voie Mehler-ascorbate peroxydase ou le cycle eau-eau (water-water cycle) (d'après Miyake 2010). AsA, ascorbate; DHA, déhydroascorbate; Fd, ferrédoxine; FNR, Fd-NADP oxydoréductase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; MDHA, monodéhydroascorbate; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase; DHAR, déhydroascorbate réductase; GR glutathion réductase; GSH, glutathion réduit, GSSG, glutathion oxydé, O_2^- , anion superoxyde; PSI, photosystème I; PSII, photosystème II; SOD, superoxyde dismutase.

4.6. La chlororespiration

La chlororespiration décrit un transport d'électrons entre de nouveaux transporteurs, inclus dans la membrane des thylakoïdes, le complexe NAD(P)H déshydrogénase et une plastoquinone oxydase (PTOX). Le complexe NAD(P)H déshydrogénase réduit les

plastoquinones et participe aux voies de transfert d'électrons autour du PSI. Il est proposé que ce transport d'électrons participe à la formation d'ATP en cas de fortes demandes et de conditions de stress sévères. La chlororespiration peut également limiter la pression des électrons sur le PSI est aussi prévenir la photoinhibition. La chlororespiration pourrait aussi être couplée avec la biosynthèse des caroténoïdes selon le schéma proposé par [Bennoun \(2001\)](#) et avoir un rôle particulièrement important dans les organites tels que les chromoplastes.

4.7. Les métabolites antioxydants

Les composants principaux de ce système antioxydant comprennent les caroténoïdes, l'ascorbate et les polyphénols ([Trianaphylidès and Havaux, 2009](#)).

- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes ont une fonction essentielle dans la photosynthèse et la photoprotection. Les caroténoïdes, y compris les xanthophylles (caroténoïdes oxygénés), sont des antioxydants membranaires qui peuvent atténuer les molécules de 3Chl^* et de $^1\text{O}_2$, inhiber la peroxydation lipidique, et stabiliser les membranes ([Demmig-Adams et al., 1996; Frank and Cogdell, 1996; Stahl and Sies, 2003; Trianaphylidès and Havaux, 2009](#)). Les antennes du PSII contiennent plusieurs types de pigments xanthophylles: la lutéine, la violaxanthine, la néoxanthine et la zéaxanthine. La lutéine est la xanthophylle la plus abondante; elle représente 60 % des xanthophylles totales. De par son rôle de "quenching" des 3Chl^* et $^1\text{O}_2$, et des caroténoïdes triplets, la lutéine protège les antennes (LHCII) contre le photoblanchiment ([Formaggio et al., 2001; Dall'Osto et al., 2006](#)).

La zéaxanthine a un rôle central dans la photoprotection. Lorsque les plantes sont exposées à une forte intensité lumineuse, la zéaxanthine est convertie en violaxanthine par l'enzyme violaxanthine de-époxydase. Ce phénomène est impliqué dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur ([Ruban et al., 2007; Jahns et al., 2008; Murchie and Niyogi, 2011; Takahashi and Badger, 2011](#)).

- L'acide ascorbique

L'ascorbate est un antioxidant soluble, abondant dans les feuilles des plantes. Le chloroplaste compte 30-40 % de l'ascorbate total de la cellule ([Noctor and Foyer, 1998](#)). Dans le

chloroplaste, l'ascorbate et le glutathion sont oxydés par H_2O_2 généré par la réaction de Mehler (Foyer and Halliwell, 1976; Asada 1999). Plus tard, une vision supplémentaire du rôle de l'ascorbate dans la photoprotection et de son importance dans la photosynthèse en général en cas de stress photooxydatif, a été apporté par Smirnoff (2000b), Noctor and Foyer (1998), Asada (1999) et Niyogi (1999). La vision actuelle du rôle de l'ascorbate peut être résumée de la façon suivante d'après Smirnoff (2000a) (Figure 4.7):

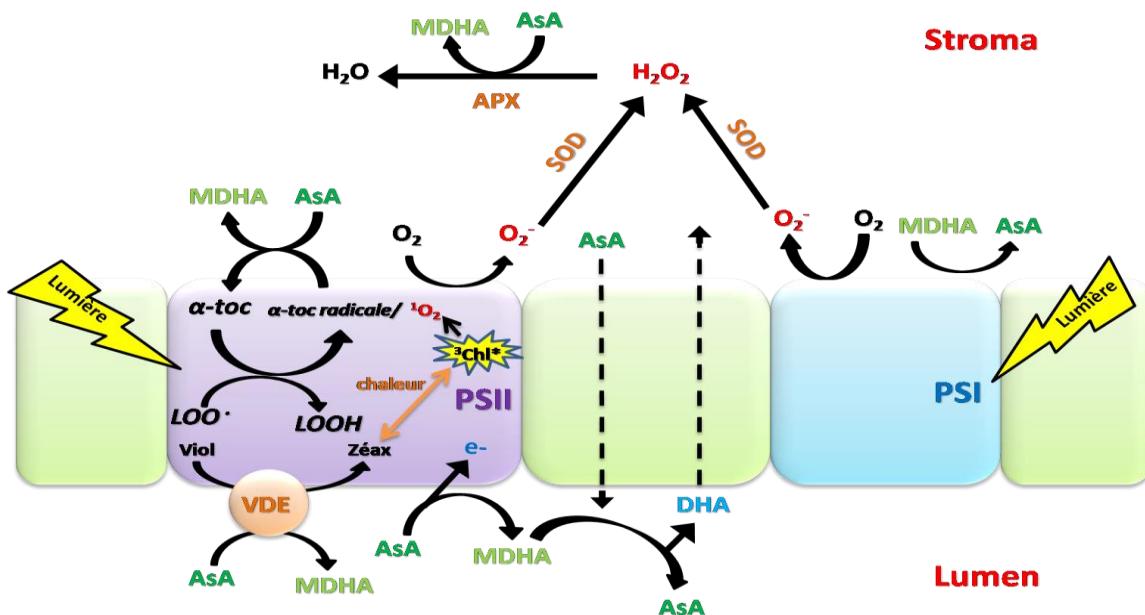


Figure 4.7. Représentation schématique montrant le rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse en situation d'excès de lumière (d'après Smirnoff 2000a). AsA, ascorbate; 3Chl*, chlorophylle triplet; DHA, déhydroascorbate; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; LOO[·], radical lipide peroxyl; LOOH, lipide hydroperoxyde; MDHA, monodéhydroascorbate; O_2^- , anion superoxyde; 1O_2 , oxygène singulet; PSI, photosystème I; PSII, photosystème II; SOD, superoxyde dismutase; α -toc, α -tocophérol; Viol, violaxanthine; VDE, violaxanthine de-époxydase; Zéax, zéaxanthine.

* L'ascorbate peut directement piéger les molécules O_2^- , OH^- et 1O_2 . La réaction non-enzymatique de l'ascorbate avec 1O_2 donne le déhydroascorbate (DHA) et H_2O_2 (Kramarenko et al., 2006). Le DHA peut être reconvertis en ascorbate par les enzymes du cycle ascorbate-glutathion (Noctor and Foyer, 1998).

* L'ascorbate participe également de façon indirecte aux mécanismes de détoxication enzymatique d' H_2O_2 grâce à des enzymes antioxydantes comme l'ascorbate peroxydase (APX).

- * L'ascorbat est nécessaire pour le cycle des xanthophylles, il est cofacteur de la violaxanthine de-époxydase (VDE) impliquée dans la zéaxanthine qui participe à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur.
- * L'ascorbat est nécessaire pour le fonctionnement détoxifiant de l' α -tocophérol, car il contribue de son recyclage (Fryer 1992).
- * L'ascorbat luminal peut être un donneur d'électron au PSII (Smirnoff 2000b).

- Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, qui ont en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Chez les végétaux, il existe de très nombreuses classes parmi ceux-ci, des molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que les acides phénoliques, mais aussi des acides hydroxycinnamiques, des flavonoïdes etc... et jusqu'à des composés très polymérisés comme les tannins (Akowauh et al., 2004).

Ces métabolites secondaires ont été reconnus comme ayant de multiples rôles dans les réponses des plantes à un large éventail de contraintes environnementales (Dixon and Paiva, 1995). Le rôle biologique des composés phénoliques en réponse au stress est attribué à leur capacité à neutraliser les formes activées et toxiques de l'oxygène (${}^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 et OH^-) (Agati and Tattini, 2010). Les conditions de stress photooxydatif sont connues pour améliorer l'expression des gènes de la biosynthèse des flavonoïdes (Close and McArthur 2002; Agati et al., 2012; Agati et al., 2013). Les acides hydroxycinnamiques notamment comme l'acide chlorogénique, ont également des activités antioxydantes qui permettent une détoxification des ERO (Sato et al. 2011). Cependant, leur localisation essentiellement vacuolaire rend peu vraisemblable un rôle direct pour inhiber la génération des ERO au niveau des chloroplastes en cas de stress photooxydatif. Par contre, H_2O_2 produit dans le chloroplaste peut diffuser vers la vacuole où il est éliminé via l'oxydation de ces composés phénoliques (Yamaski et al., 1997).

4.8. Les enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes se retrouvent dans les différents organites et compartiments cellulaires. Leur localisation permet la détoxification efficace des ERO générés par un stress photooxydatif. L'anion superoxyde (O_2^-) est généré à partir de O_2 lors d'un blocage de la chaîne d'électrons photosynthétiques (Foyer and Noctor, 2009). O_2^- peut être éliminé à l'aide

de la superoxyde dismutase (SOD) ce qui conduit à la formation d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Foyer et al., 1994). En éliminant O_2^- , la SOD diminue le risque de la formation d' OH^- , et par conséquent l'intensité du stress oxydatif (Gill and Tuteja, 2010).

H_2O_2 a une durée de vie plus longue, il peut à son tour soit être sectionné au niveau de la liaison O-O et donner OH^- , soit être détoxifié par la catalase (CAT) dans les péroxysondes *via* un processus qui implique l'oxydation des acides gras, la photorespiration et le catabolisme de la purine (Arrigoni and De Tullio, 2002). La catalase est une enzyme qui a un rôle majeur dans la détoxification d' H_2O_2 , une molécule de CAT peut convertir environ 6 millions d' H_2O_2 en H_2O et O_2 par minute (Gill and Tuteja, 2010).

De plus, H_2O_2 peut être détoxifié grâce à l'ascorbate peroxydase (APX) *via* le cycle Ascorbate/Glutathion Asada-Halliwell (Foyer and Halliwell, 1976). L'affinité élevée de l'APX pour H_2O_2 lui donne un rôle essentiel dans sa détoxification (Gill and Tuteja, 2010). Dans le cycle Asada-Halliwell, l'APX utilise l'ascorbate comme donneur d'électrons pour réduire l' H_2O_2 en eau et produit du MDHA (Figure 4.8). Le MDHA est soit dissocié directement en ascorbate et DHA, dans le cas où la réduction directe du MDHA en l'ascorbate *via* la ferrédoxine réduite est bloquée (Miyake and Asada, 1994), soit réduit en ascorbate par la MDHAR (Sano et al., 2005). Le DHA peut être lui aussi réduit en ascorbate par la DHAR, un enzyme dépendant de l'oxydation du glutathion (Shimaoka et al., 2003). Enfin, le glutathion oxydé (GSSG) est de nouveau réduit en glutathion (GSH) par la glutathion réductase (GR) (Foyer et al., 1994).

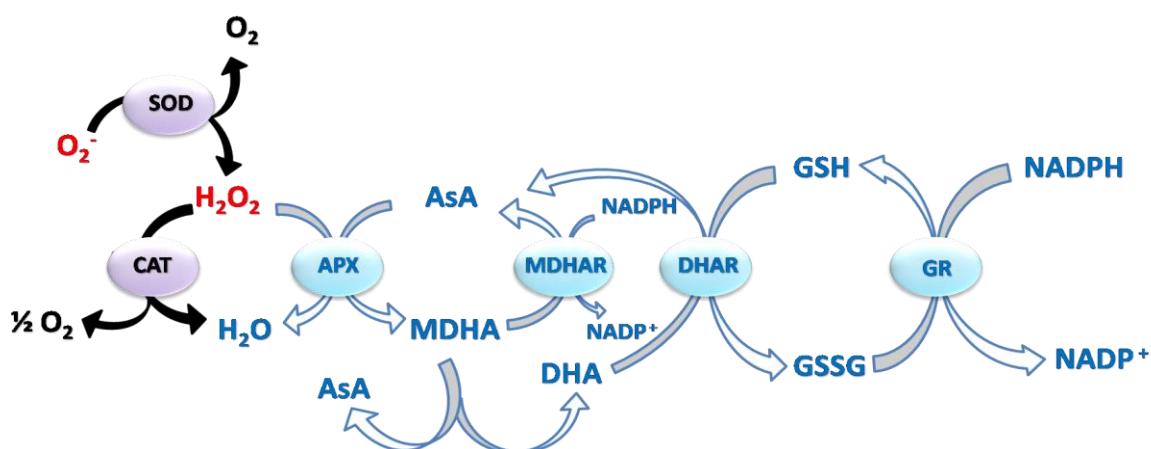


Figure 4.8. Représentation schématique montrant la détoxification des ERO par le cycle ascorbate/glutathion et l'action des enzymes SOD et CAT. SOD, superoxyde dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbate peroxydase; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase; DHAR, déhydroascorbate réductase; GR glutathion réductase.

5. La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne et ses applications pour approcher les réactions photosynthétiques et le transport des électrons

L'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques n'est pas toute utilisée dans les réactions photosynthétiques. Une partie de cette énergie est réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence (Figure 5). Cette fluorescence, qui représente la fluorescence de la chlorophylle *a* des antennes du PSII, varie avec le temps et est considérée comme proportionnelle à l'énergie utilisée pour les processus photochimiques.

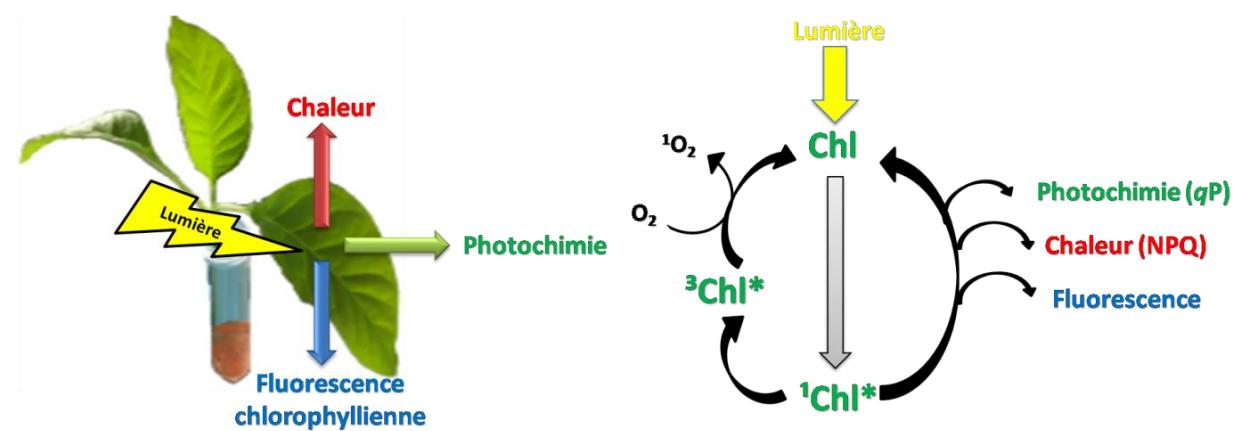


Figure 5. Représentation schématique de la gestion d'énergie lumineuse absorbée, et des voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée. 1Chl^* et 3Chl^* : chlorophylle excitée à l'état singulet et triplet, respectivement.

5.1. La cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne et les paramètres photosynthétiques calculés

Cette technique a été développée par Schreiber (1986) et Schreiber et al. (1986). Elle permet d'avoir des informations sur l'appareil photosynthétique en mesurant le rendement de la fluorescence chlorophyllienne et en analysant le phénomène de "quenching" de la fluorescence chlorophyllienne. Le *quenching* correspond à l'extinction de fluorescence. Lorsqu'une plante est adaptée à l'obscurité (20 minutes environ), l'utilisation d'une lumière modulée de très faible intensité maintient les centres réactionnels ouverts (tous les accepteurs Q_A et Q_B sont oxydés), il n'y a pas de transfert d'électrons. La fluorescence chlorophyllienne enregistrée est minimale (F_0). La plante est ensuite éclairée avec un flash de lumière saturante (400-700 nm) (environ $8,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pendant 0,5 à 1 s), tous les centres réactionnels du PSII se ferment et restent bloqués dans l'état Q_A^- réduit. La fluorescence chlorophyllienne augmente et atteint une valeur maximale (F_m). Le retour de F_m à F_0 est relativement rapide et

lié au transfert de la charge de Q_A^- vers Q_B dans le PSII. La fluorescence variable (F_v) indique la proportion des centres réactionnels du PSII à l'état réduit. La fluorescence F_v est calculée ($F_v = F_m - F_0$) et représente la fraction de l'énergie photonique convertie en énergie chimique (Figure 5.1). Le rendement quantique maximum des réactions photochimiques du PSII (Kitajima and Butler, 1975):

$$\Phi P_0 = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

Il représente l'efficience quantique des centres réactionnels ouverts du PSII (Maxwell and Johnson, 2000). Dans les conditions normales, ce paramètre est d'environ $0,832 \pm 0,004$ chez les plantes supérieures (Björkman and Demmig, 1987). F_v / F_m est utilisé comme indicateur pour détecter la photoinhibition ou d'autres stress qui affectent le PSII (Maxwell and Johnson, 2000). Lorsque la plante est éclairée par une lumière actinique, la fluorescence chlorophyllienne augmente puis décroît après quelques secondes pour se stabiliser. La valeur de la fluorescence stationnaire ($F_s < F_0$) représente la proportion des centres réactionnels du PSII qui ne participent pas au transport d'électrons. L'application de flash saturant conduit à la fermeture de tous les centres réactionnels, et permet de mesurer ainsi le rendement maximal de fluorescence sous éclairage F_m' ($F_m' < F_m$). La fluorescence variable est alors calculée $F_v' = F_m' - F_s'$, elle représente la proportion des centres réactionnels actifs qui ont participé aux réactions photochimiques sous éclairage. Le rendement photochimique opérationnel du PSII est estimé d'après Genty et al. (1989):

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s') / F_m'$$

La diminution observée de la fluorescence après le niveau enregistré (F_m) peut être attribuée aux processus photochimique et non-photochimique. Le quenching photochimique qP , est une approximation de l'état redox de l'accepteur primaire d'électron Q_A sous illumination. qP représente la proportion des centres réactionnels ouverts du PSII qui participe au transport d'électrons de Q_A^- vers Q_B et ensuite vers le pool de PQ (Van Kooten and Snel, 1990). Ce paramètre est déterminé d'après Schreiber et al. (1986) et Genty et al. (1989):

$$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0)$$

Le quenching non photochimique de la fluorescence variable qN est proportionnel au nombre de centres réactionnels du PSII ne participant pas au transport d'électrons (Schreiber et al., 1986; Van Kooten and Snel, 1990):

$$qN = (F_v - F_v') / F_v = 1 - (F_v' / F_v)$$

Le quenching non photochimique est considéré comme un mécanisme de protection de l'appareil photosynthétique en cas d'excès d'excitation (Demmig-Adams and Adams, 1996; Horton et al., 1996; Niyogi 1999). Il peut être estimé en prenant en compte le niveau maximal de la fluorescence chlorophyllienne à l'état adapté à l'obscurité F_m , et à la lumière actinique F_m' (Schreiber et al., 1986):

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

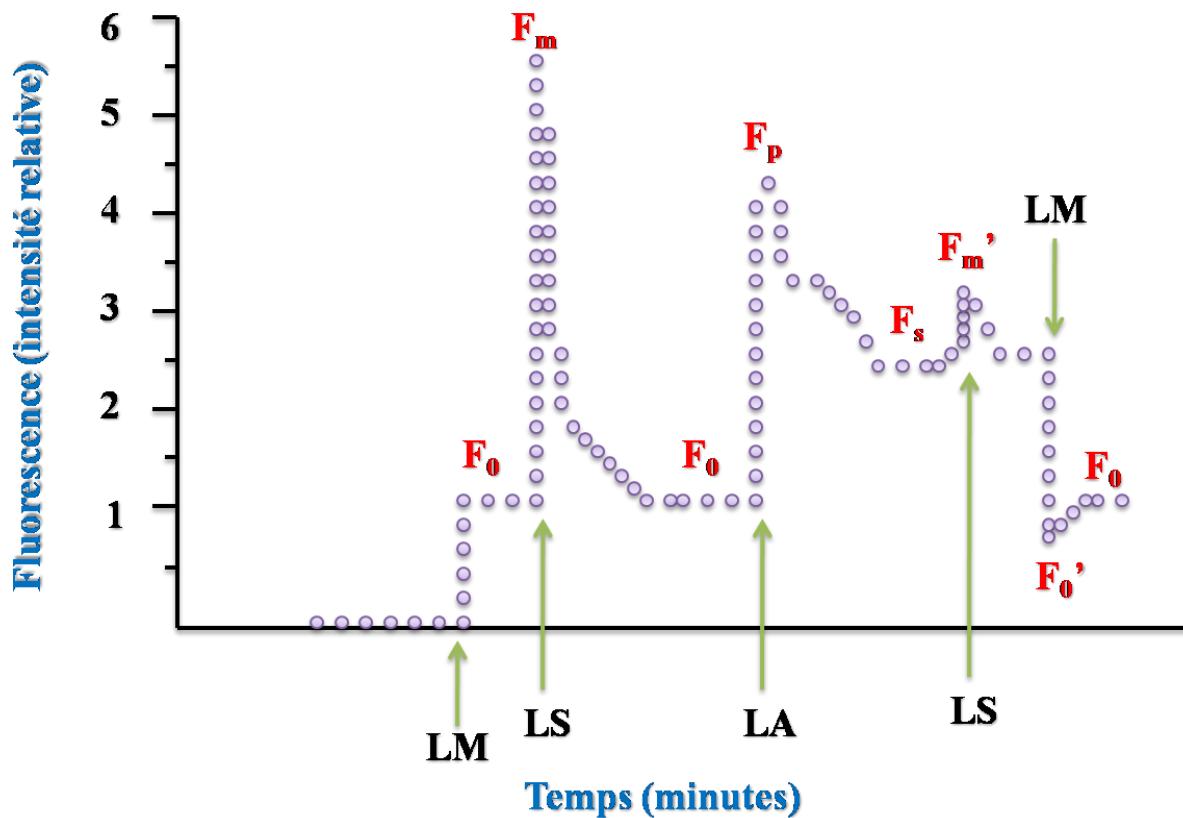


Figure 5.1. Représentation schématique montrant la variation de la fluorescence modulée en fonction du temps (d'après Rohaček 2002). F_0 : fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité; F_0' : fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière; F_v : fluorescence variable; F_m : fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité; F_m' : fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière; LM: lumière modulée; LS: lumière saturante; LA: lumière actinique.

5.2. La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et les paramètres photosynthétiques calculés (test *OJIP*)

La cinétique rapide de la fluorescence est mesurée en utilisation l'appareil Handy-PEA. Le matériel photosynthétique adapté à l'obscurité (environ 20 minutes) est illuminé avec un flash de lumière saturante pendant quelques secondes (1 à 6 secondes). Sur une échelle logarithmique, cette cinétique représente une courbe nommée la courbe de Kautsky ([Kautsky and Hirsh, 1931](#)). Cette courbe montre des phases de transitions: O, J, I, P, qui représentent les différentes étapes d'oxydoréduction des accepteurs d'électrons du PSII (Q_A , Q_B) et des plastoquinones ([Strasser et al., 2000; 2004](#)) ([Figure 5.2.A](#)).

La fluorescence au niveau de transition O, appelé aussi F_0 , est mesurée après 50 μ s d'illumination ($3,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La phase OJ se termine à 2 ms où se situe l'étape J ([Strasser and Strasser, 1995](#)). La fluorescence minimale F_0 représente l'état d'oxydation de Q_A où les centres réactionnels du PSII sont "ouverts". La valeur F_0 peut être utilisée comme indicateur de l'état redox de Q_A au début de l'illumination ([Tóth 2006](#)). La phase OJ représente l'état de la réduction progressive de Q_A et la fermeture graduelle des centres réactionnels du PSII ([Neubauer and Schreiber, 1987](#)). Plusieurs facteurs peuvent influencer la phase OJ, parmi eux: l'état de l'antenne du PSII, l'état redox du pool des plastoquinones et les limitations du côté donneur d'électrons du PSII ([Tóth 2006](#)). L'étape J, qui se trouve à 2 ms dans la cinétique de fluorescence, peut refléter l'échange d'une molécule de PQH_2 avec une molécule de plastoquinone au site de Q_B . Il est admis que l'étape J représente le maximum de réduction de Q_A . L'étape I est déterminée à 30 ms et correspond à une réduction de Q_B et à l'accumulation de $Q_A^-Q_B^-$ ([Strasser and Strasser, 1995](#)), elle peut aussi exprimer la réoxydation d'une molécule de plastoquinol par le complexe de Cyt b/f ([Tóth 2006](#)). La phase JI peut donc refléter la réduction partielle du pool de plastoquinones. L'augmentation de la fluorescence jusqu'à la transition P, réflekte une accumulation progressive de $Q_A^-Q_B^{-2}$ ([Strasser and Govindjee, 1991](#)). La phase IP peut donc représenter la réduction du côté accepteur du photosystème I. Le niveau maximum de fluorescence (F_m) est atteint quand toutes les Q_A sont réduites ainsi que le pool de plastoquinone. Strasser et ses collaborateurs ont analysés ces paramètres et proposés un modèle: le test *OJIP* ([Figure 5.2.B](#)).

Dans notre étude les paramètres du test *OJIP* ont été utilisés comme indicateur pour déterminer les réponses de l'appareil photosynthétique au stress induit par le clomazone. Les détails de ces paramètres et leurs significations physiologiques sont exprimés dans le tableau ci-dessous ([Tableau 1](#)).

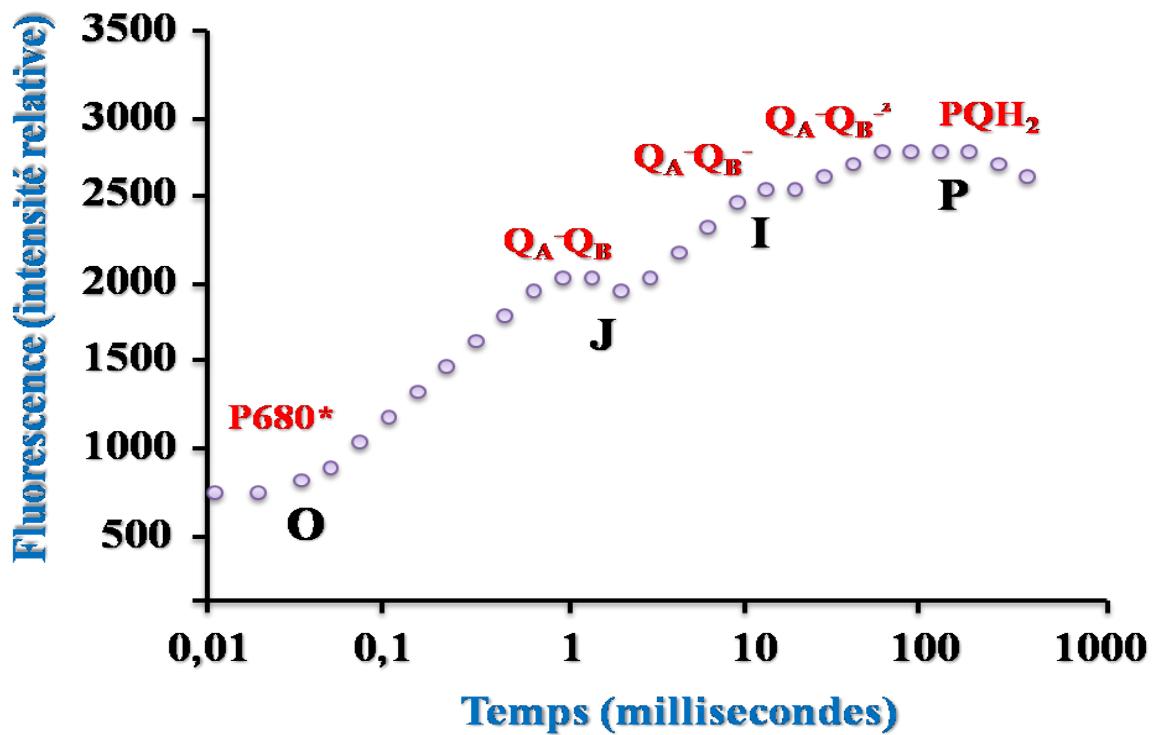


Figure 5.2.A. La courbe de Kautsky montrant les transitions *OJIP*. Q_A et Q_B : accepteurs d'électrons du PSII; PQH_2 : Plastoquinone réduite (Strasser et al., 2000; 2004; Stirbet and Govindjee, 2011).

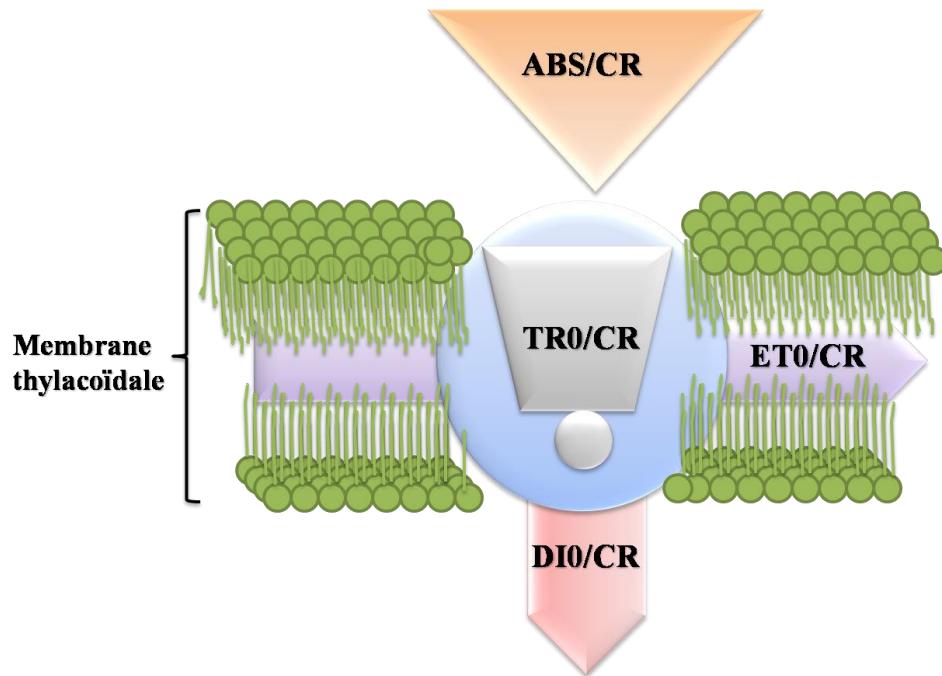


Figure 5.2.B. Modèles expriment les différentes voies de dissipation de l'énergie: flux total d'absorption d'énergie lumineuse par l'antenne du PSII (ABS), le flux d'énergie piégé "Trapping" (TR0), l'énergie dissipée en chaleur (DI0) et le flux d'électrons transportés (ET0) par le nombre des centres réactionnels actives (CR_s).

Le paramètre ABS/CR représente la taille des LHCII par rapport au nombre de centre réactionnel fonctionnel du PSII (Strasser et al., 1999). Le paramètre TR0/CR réflete d'une part l'efficacité du transport de l'énergie d'excitation au centre réactionnel, et d'autre part l'efficacité du centre réactionnel à piéger cette énergie "*trapping*". Le paramètre ET0/CR permet d'estimer la réoxydation de Q_A par le transfert des électrons dans la chaîne de transport. Le paramètre DI0/CR représente la fraction de l'énergie lumineuse dissipée sous forme de chaleur par le centre réactionnel du PSII à l'état fonctionnel (Strasser et al., 2000) (Figure 5.2.B).

Tableau.1. Quelques paramètres du test JIP

Flux d'énergie spécifique exprimé par le centre réactionnel (CR)

La vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable.....**M0** = $(F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_m - F_{50\mu s}) / 0,25 \text{ ms}$

La fluorescence variable dépendante de la réduction de Q_A**VJ** = $(F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_m - F_{50\mu s})$

La proportion de photons utilisés pour la réduction de Q_A ...**TR0/CR** = $(M0/V_J) = (ABS/CR) (F_v/F_m)$

La proportion d'électrons au delà de Q_A^- **ET0/CR** = $(TR0/CR) (1 - V_J)$

$$= (TR0/CR) (ET0/TR0)$$

La proportion de photons absorbés.....**ABS/CR** = $(TR0/CR) / [(F_m - F_{50\mu s})/F_m]$

La proportion d'énergie dissipée en chaleur.....**DI0/CR** = $(ABS/CR) - (TR0/CR)$

Efficacité (ratios ou rendements)

Le rendement maximal des réactions photochimiques primaires du PSII, ou l'efficacité maximal avec laquelle un photon absorbé participe à la réduction de Q_A**TR0/ABS** = $(TR0/CR) / (ABS/CR)$

$$= (F_m - F_{50\mu s})/F_m$$

Efficacité avec laquelle un photon absorbé induit un électron transporté

au delà de Q_A^-**ET0/ABS** = $(ET0/CR) / (ABS/CR)$

Efficacité avec laquelle une excitation piégée peut se déplacer un électron dans la chaîne de transport d'électrons au delà de Q_A^- **ET0/TR0** = $(ET0/CR) (TR0/CR) = 1 - V_J$

Indice de Performance

La fonction des Composés d'absorption de l'énergie lumineuse, l'efficacité de Q_A réduite et la conversion

d'énergie au transport des électrons.....**PI_{abs}** =

$$[CR/ABS] [(TR0/ABS) / (F0/Fm)] [(ET0/TR0) / V_J]$$

L'indice "0" indique que la quantification du comportement du PSII au début de l'induction de la fluorescence. **ABS** est proportionnel à la concentration des pigments photosynthétiques par l'antenne de chlorophylle.

6. Objectifs de la thèse

Les données bibliographiques montrent que le clomazone inhibe une des voies de synthèse des caroténoïdes et son action herbicide est généralement attribué à cet effet. Certaines données complémentaires relativisent l'action inhibitrice des caroténoïdes, notamment parce qu'il existe une autre voie de synthèse (la voie cytoplasmique). Il est alors proposé que le clomazone provoque un stress photooxydatif d'origine plurifactorielle, non encore précisément décrit et responsable de son action de blanchiment des feuilles.

L'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps de:

- valider ou non l'existence d'un stress photooxydatif en présence de clomazone et d'en préciser le mode d'action en étudiant le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques. Ceci a été réalisé en mesurant les cinétiques de fluorescence chlorophyllienne et l'évolution d'oxygène des chloroplastes isolés chez deux variétés de tabac *Xanthi* et *Virginie*;
- d'étudier les mécanismes de protection contre le stress photooxydatif en suivant les voies de détoxification enzymatique des ERO.

Dans une deuxième partie, des prétraitements par la lumière, capable de stimuler les défenses antioxydantes, ont été recherchés, dans l'objectif d'amélioration de la tolérance à l'herbicide.

