

Matériels

1. La chambre de culture climatisée (SANYO MLR-351H Versatile Environmental Test Chamber)

La chambre climatique SANYO ([SANYO Electric Co., Ltd., Japan](#)) permet précisément de contrôler et reproduire une grande gamme de température, d'humidité et des cycles d'éclairages nécessaires dans les études de recherche. La chambre peut être utilisée dans de multiples domaines:

- La croissance des plantes
- La culture des cellules, des tissus et des organes végétales
- L'incubation et la croissance des insectes
- Les tests électroniques
- Les tests alimentaires
- Les tests de conditionnement

Cette chambre représente (i) un écran LCD permettant un affichage visuel de l'opération, (ii) un fonctionnement plus facile et intuitif, (iii) une fonction programmée de la température, de l'humidité et de l'éclairage, (iv) un microprocesseur PID pour contrôler la température et l'humidité, (v) un capteur d'humidité de type membrane moléculaire élevée, (vi) un calibrage facile et une fonction d'enregistrement des données.

La programmation de la lumière et l'humidité est possible par cycle temps/température. De multiples programmes peuvent être connectés, et les fonctionnements de départ du jour et de l'heure peuvent être programmés.

Le microprocesseur PID de contrôle de la température et de l'humidité (de 0 à 50 °C, de 0 à 20000 lux et de 55 à 90 % d'humidité relative (RH)) permet la création d'environnements optimaux utiles dans différentes type d'applications.

Les données opérationnelles de 2 semaines (intervalles de 6 minutes) peuvent être automatiquement enregistrées, visualisées sur le panneau de commande et également transmises à un PC *via* RS-232C et une carte d'interface (MTR- 480).



Figure 1. La chambre de la culture SANYO MLR-351H

2. Spectrophotomètre visible à balayage (biochrom UV/Visible Libra S22)

Le spectrophotomètre biochrom Libra S22 ([Biochrom Ltd., UK](#)) permet de réaliser des mesures en absorbance pour les analyses biochimiques. Ce spectrophotomètre permet d'enregistrer les courbes d'étalonnage, de réaliser des balayages de spectres et des suivis de cinétique d'absorbance. Tous les graphiques et les courbes affichées peuvent être imprimés. Une connexion à un PC est assurée pour une acquisition et un transfert des données sur Excel. Le logiciel d'acquisition possède une option pour des applications avancées et une manipulation plus aisée.

Des équations paramétrables sont programmables en mode multilongueurs d'onde et 18 méthodes peuvent être sauvegardées en mémoire.

Il détecte une gamme spectrale de 330 à 800 nm, et en utilisant des cuves standards (10 mm).



Figure 2. Spectrophotomètre biochrom Libra S22

3. Le Lecteur de microplaques à absorbance (PowerWave HT)

Le lecteur de microplaque ([Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France](#)) est un spectrophotomètre visible à balayage permettant de réaliser des mesures d'absorbance, et des cinétiques à plusieurs longueurs d'ondes. C'est un monochromateur détectant les longueurs d'onde continues de 200 à 999 nm avec une capacité de lecture de 96 puits (1 cm) sur microplaque, avec trois vitesses de lecture, un mode balayage et un contrôle de la température de 4 °C à 50 °C assurant une uniformité de la température nécessaire pour les mesure en cinétique. Cet appareil est équipé d'une lampe à xénon pour les mesures d'absorbance en UV et également en lumière visible.

Le temps de lecture d'une plaque dépend à la méthode de lecture. Le mode balayage est le plus rapide des trois modes. La vitesse réelle de lecture peut aussi varier en fonction de la longueur d'onde sélectionnée.

Chaque longueur d'onde a une localisation unique dans le monochromateur, et les autres localisations nécessitent des durées variables de temps à positionner.

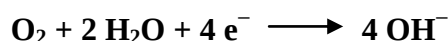


Figure 3. Le lecteur de microplaque PowerWave HT

4. L'électrode de Clark

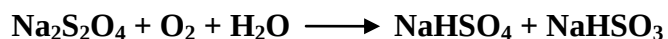
Le taux de transfert des électrons a été déterminé par polarographie à la température de la pièce en mesurant l'oxygène dégagé ou consommé grâce à une électrode de Clark ([Oxygraph système DW1, Hansatech Instruments, Norfolk, UK](#)). Le signal émis lors du changement de la concentration en oxygène dans la chambre réactionnelle est transmis par l'oxygraphe à un logiciel qui permet de suivre ces évolutions et d'exprimer les modifications de concentrations d'oxygène en ($\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ chlorophylle min}^{-1}$).

Le principe de cette technique réside dans l'application d'une différence de potentiel de 0,7 V entre l'anode (en argent) et la cathode (en platine) reliées par une petite couche d'électrolyte (KCl 50 % saturé). Cela permet à l'oxygène présent dans la solution d'être ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant la réaction ci-après:



Cette réaction génère un très faible courant proportionnel à la concentration en O_2 contenu dans l'échantillon de chloroplastes intacts ou de thylakoïdes. Par la suite, ce courant est amplifié et mesuré. Un thermorégulateur est relié à la chambre réactionnelle afin de limiter les variations de température, qui pourrait fausser la mesure car la concentration en O_2 d'une solution dépend de la température. La température a ainsi été maintenue stable à 25 °C pendant toutes les étapes de manipulations. Les échantillons ont été éclairés avec une lumière blanche continue. Le flux de photons (PAR) est de 500 à 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Le milieu d'analyse est une cellule cylindrique au volume final de 1 mL. L'hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a été utilisé pour obtenir une solution exempte d'oxygène et ainsi obtenir le zéro de l'appareillage selon la réaction suivante:



De l'eau saturée en oxygène, obtenue grâce à un bullage d'air permet d'obtenir la valeur de 100 % d'oxygène. On introduit un agitateur magnétique afin d'assurer une bonne homogénéisation de la solution. La concentration de chlorophylle des échantillons mesurés dans la chambre réactionnelle était de l'ordre de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. En effet, la teneur en chlorophylle ne doit pas dépasser $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ parce que de grandes quantités de chloroplastes actifs peuvent produire de l' O_2 à des taux assez élevés, ce qui conduit à la formation de bulles et fausse les résultats.

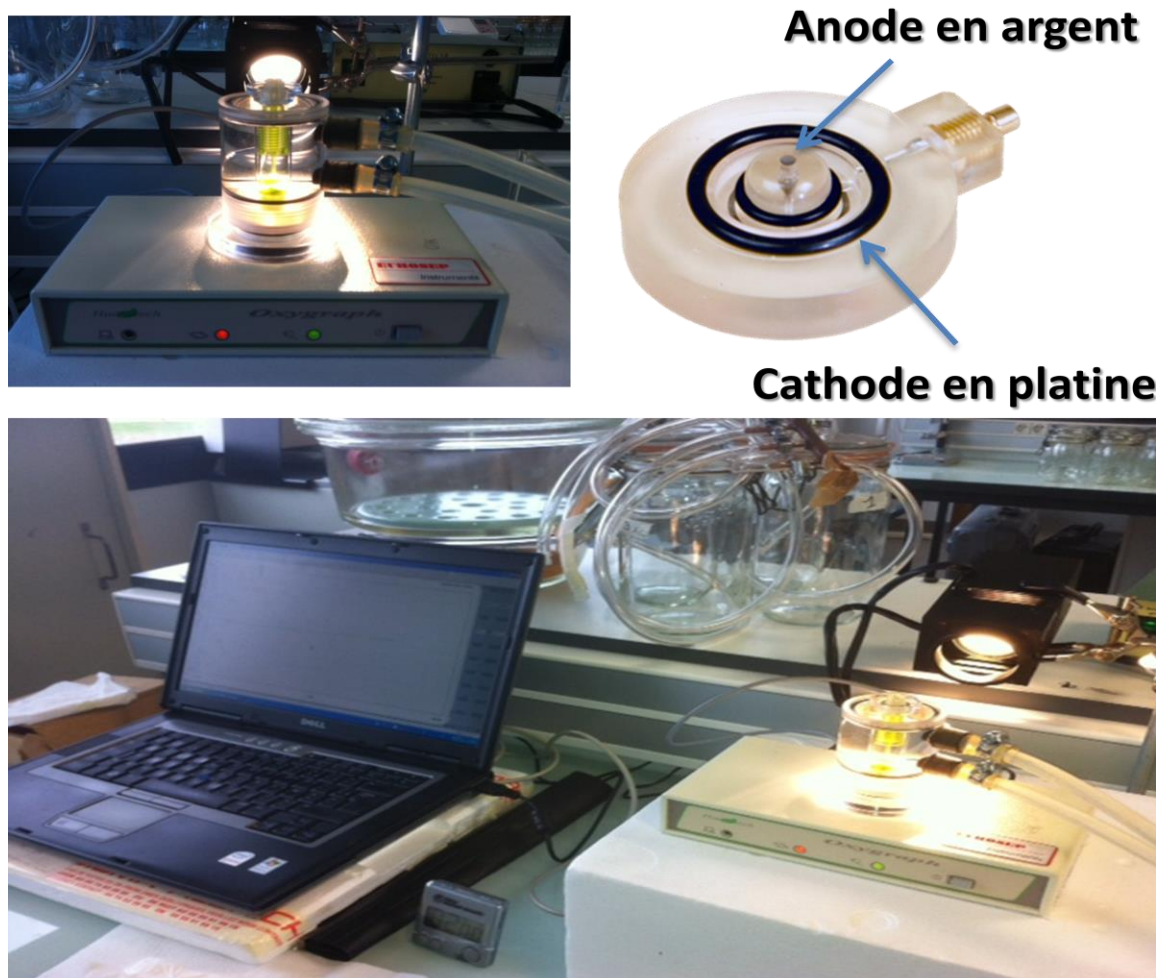


Figure 4. Électrode d'oxygène de Clark

5. Handy-PEA

Le Handy-PEA ([Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK](#)) effectue des mesures de cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne sur des périodes de temps courtes.

Le signal de la fluorescence chlorophyllienne reçu par le capteur au cours de l'enregistrement est numérisé à l'intérieur de l'unité de commande. Ce signal numérisé est sauvegardé à des vitesses différentes dépendant des différentes phases de la cinétique d'induction. Initialement, les données sont présentées à des intervalles de 10 μ s à 0,3 ms. Les données enregistrées sont de 100 kHz avec 12 bit (0-4095 bits) de résolution.

La lumière est fournie par trois LEDs ultra-lumineuse rouge, optiquement filtrée pour une longueur d'onde de 650 nm facilement absorbé par les chloroplastes, avec une intensité lumineuse maximale de 3500 μ mol m⁻² s⁻¹ à la surface de l'échantillon. Le détecteur est une photodiode PIN à haute performance avec un filtre RGs. Ce filtre empêche la lumière rouge émise par les LEDs d'atteindre le détecteur de fluorescence.

Les échantillons peuvent être adaptés à l'obscurité par l'utilisation des pinces à feuilles (leafclips de 4 mm de diamètre). La lumière est concentrée par des lentilles pour assurer un éclairage uniforme *via* la pince sur la surface de feuille.

Jusqu'à 1000 enregistrements allant de 0,1 à 300 secondes peuvent être sauvegardés dans la mémoire de l'Handy-PEA. Ces données enregistrées avec les paramètres calculés peuvent être visualisées en format numérique à l'écran de l'Handy-PEA ou transférées *via* le logiciel de transfert et d'analyse des données de Windows[®].



Figure 5. Chlorophylle fluorimètre d'Handy-PEA

6. Fluorescence Monitoring System (FMS1) (*Pulse Amplitude Modulated*)

Le système de mesure de la fluorescence chlorophyllienne FMS1 ([Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK](#)) est un fluorimètre à pulses modulés. Ce système est équipé pour une utilisation en laboratoire et également en plein champs. Il est adapté d'un échantillonnage non-invasif pour mesurer la fluorescence chlorophyllienne dans des conditions de lumière naturelle ou artificielle.

Le FMS1 se compose d'une unité qui contrôle tous les appareils électroniques et optiques, et les sources lumineuses qui sont nécessaires afin d'effectuer les mesures. Ceux-ci sont optiquement reliés à l'échantillon par un câble à fibres optiques qui est approprié pour l'insertion dans des containers d'échantillons tels que des électrodes d'oxygène, des chambres d'analyse de gaz et des boîtes de Pétri.

Une connexion à un PC sous Windows® permet le contrôle de l'appareil et une présentation des données. Toutes les données de mesure et les paramètres calculés sont sauvegardés dans une mémoire bien protégée. L'appareil peut stocker jusqu'à six protocoles expérimentaux. Lorsque

la mesure est terminée, les données peuvent être téléchargées sur le logiciel Windows® pour une analyse complète.

Toutes les sources lumineuses nécessaires pour les mesures sont à l'intérieur de l'instrument: une source de 594 nm Amber modulé par un contrôle de la fréquence en 4 étapes (en option 470 nm LED bleu), une source de lumière halogène à double usage fournissant une lumière actinique ($0-3,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 50 étapes) et des pulses saturés ($0-20,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 100 étapes) et une source préférentielle LED 735 nm infrarouge pour l'excitation du photosystème I (PSI) permettant une détermination précise de la fluorescence F_0' .

Le système de pince à feuille est utilisé afin d'adapter les tissus végétaux à l'obscurité pour la réalisation des expériences nécessitant des mesures adaptées à l'obscurité (par exemple la mesure F_v/F_m) ou des situations qui exigent une adaptation à des doses standards de lumière actinique.

Le système est constitué de petites pinces légères et deux types différents d'adaptateur de câble à fibres optiques. La pince, elle-même a une petite plaque qui doit être fermée lorsque le clip est fixé pour l'adaptation à l'obscurité. Le système est équipé aussi par une pince permettant d'effectuer des mesures en adaptant les feuilles à la lumière actinique (ex. Φ_{PSII} , qP , qN et NPQ).

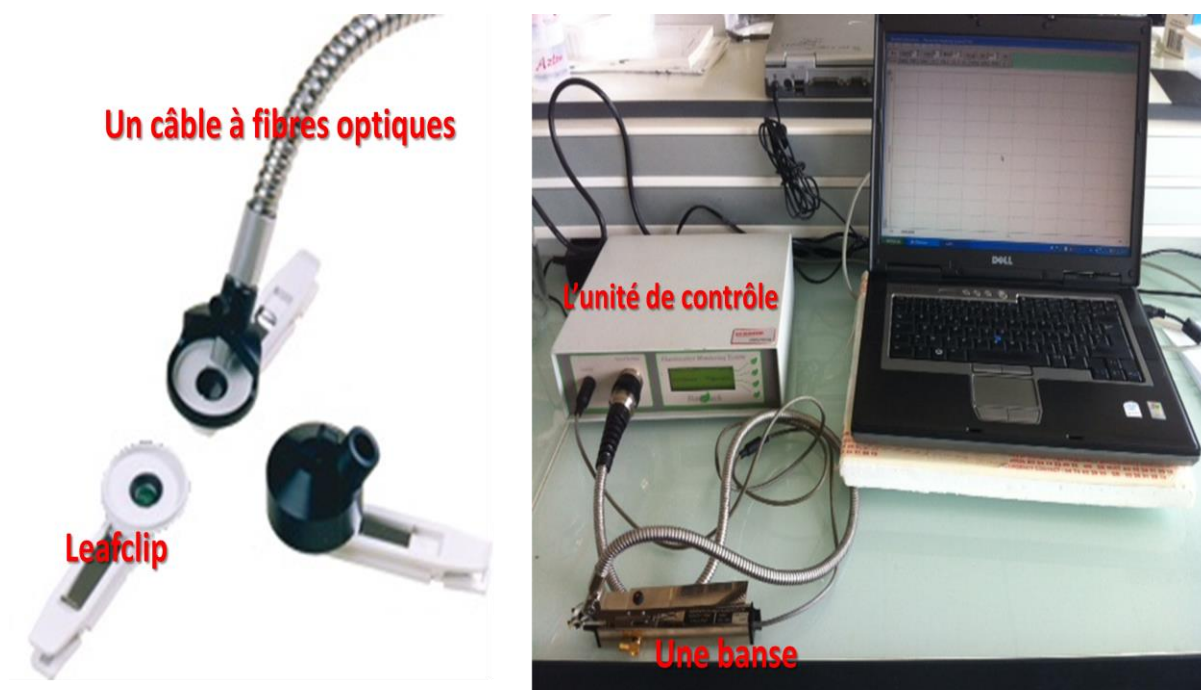


Figure 6. Fluorescence chlorophyllienne fluorimètre FMS1

7. Le système portable de la photosynthèse (LI-COR 6400)

La LI-COR 6400 ([Lincoln, Nebr., USA](#)) est un système ouvert pour les mesures de la photosynthèse et de la transpiration basé sur les différences de CO₂ et H₂O dans l'air courant qui circule dans la cuvette de la feuille. Ce système est constitué d'analyseurs de gaz situés dans la tête du capteur qui permet un bon contrôle pour répondre aux changements de la feuille. De plus, cet équipement permet de mesurer la cinétique rapide et lente de la fluorescence chlorophyllienne qui contribue à une bonne argumentation de l'état photosynthétique des échantillons.

Les taux d'humidité, de CO₂, la température et l'intensité lumineuse peuvent être établis avant d'entrer dans le système de l'appareil. Quand il y a une grande différence dans les concentrations de CO₂ et H₂O entre l'air de la chambre et l'air ambiant, une modification des concentrations entrantes de CO₂ et de H₂O est possible à réaliser.

Le contrôle de CO₂ peut être effectué à l'aide d'un injecteur de CO₂ LI-6400-01 provenant d'une cartouche de CO₂ liquide à haute pression. Le contrôle de l'humidité dans la cuvette est obtenu par une régulation du flux qui va à la cuvette. Il existe des tubes chimiques aussi pour évacuer le CO₂ et l'H₂O, et l'air circulant à travers ces tubes est régulé dans toute proportion souhaitée.

Les mesures effectuées avec les paramètres calculés peuvent être visualisés à l'écran de la LI-COR sous format numérique ou transférés *via* le logiciel (Windows® LI-6400).

Les équations pour calculer quelques paramètres de la photosynthèse d'après la LI-COR

La transpiration (*E*) (mol H₂O m⁻² s⁻¹)

$$E = \frac{F (W_s - W_r)}{100S(1000 - W_r)}$$

F: le taux de flux molaire de l'air entrant dans la chambre de feuille, μmol s⁻¹

W_s: la fraction molaire de la vapeur d'eau d'échantillonne dans IGRA, mmol H₂O mol air⁻¹

W_r: la fraction molaire de la vapeur d'eau référencié dans IGRA, mmol H₂O mol air⁻¹

S: la surface foliaire, cm²

La conductance stomatique (*g_{tw}*) (mol H₂O m⁻² s⁻¹)

$$g_{tw} = \frac{E (1000 - \frac{W_i + W_s}{2})}{W_i - W_s}$$

W_i : la concentration molaire de la vapeur d'eau à l'intérieur de la feuille, et qui est calculé à partir de température de la feuille T_i (C) et la pression atmosphérique totale P (kPa)

$$W_i = \frac{e(T_i)}{P} \times 1000$$

$e(T_i)$: la pression saturée de la vapeur d'eau (kPa) à la température T (C)

La photosynthèse nette (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

$$A = \frac{F (C_r - C_s)}{100S} - C_s E$$

C_s : la concentration de CO_2 d'échantillonne dans IGRA, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$

C_r : la concentration de CO_2 référencié dans IGRA, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$

La CO_2 intercellulaire (C_i) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$)

$$C_i = \frac{(g_{tc} - \frac{E}{2}) C_s - A}{(g_{tc} + \frac{E}{2})}$$

g_{tc} : la conductance stomatique totale de CO_2 , qui est calculé à partir de la conductance stomatique de la vapeur d'eau g_{sw} ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)



Figure 7. L'analyseur portable de la photosynthèse LI-COR 6400

8. Microscope photonique (Leica Digital Microscope 2000)

Le Leica DM 2000 est un microscope équipé pour s'adapter parfaitement non-seulement à la morphologie de l'utilisateur, mais aussi au domaine d'application, par exemple en médecine, dans des laboratoires cliniques, à la pathologie et la biologie et d'autres tâches de recherche.

Le Leica est fourni avec un bloc d'alimentation stabilisé 30W/90-250V à allumage automatique et possède 5 fonctions de focalisation, 2 à 3 vitesses de focus, un focus-stop et vis réglable. Il est équipé d'objectifs 4x, 10x, 40x avec une lampe à halogène (30W/12V) par, un filtrage comprenant un filtre Flip-out de la lumière bleu, un porte filtre pour 2 filtres. L'éclairage 50W × Hg, 75W × Xe et 100W × Hg avec une lampe à halogène 12V/100W, un condenseur standard

CL/PH codage couleur (100x-2,5 objectif) et un condenseur CADH. Le Leica possède 5 positions du bloc de filtres Les images peuvent être capturées en utilisant une caméra numérique (Leica DFC 300FX) fixée en haut du microscope, et analysées *via* le logiciel LAS (Leica).

Avec le ce logiciel, les informations peuvent être enregistrées sur l'image avec les paramètres de réglage du microscope, de la caméra et le spécimen. L'ensemble des données liées à l'image peut ensuite être récupéré facilement.



Figure 8. Leica DM 2000

Résumé

Les effets de faibles doses de clomazone 2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthyl-1,2-oxazolidin-3-one, un herbicide non-sélectif de la famille des isoxazolidinones, ont été étudiés chez *Nicotiana tabacum* L. De faibles concentrations de clomazone (1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} μM), ont été appliquées chez deux variétés de tabac (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*; *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) cultivées en hydroponie. Le transport d'électrons photosynthétiques a été étudié par l'analyse de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne et par la mesure de l'évolution de l'oxygène chloroplastique. Les résultats ont montré que le clomazone à des concentrations de 1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} μM , affecte les paramètres JIP (F_v/F_m , PI_{abs} , $1-V_j$, ABS/RC , $TR0/RC$, $DI0/RC$, $ET0/RC$ et $ET0/ABS$). Le clomazone à une concentration de 1 μM , conduit à une importante accumulation de H_2O_2 chez *Virginie* induisant la mort cellulaire programmée (PCD). Nos résultats montrent que la variété *Xanthi* présente une tolérance plus importante au clomazone que la variété *Virginie*, ce qui peut s'expliquer par une meilleure efficacité du transport d'électrons au delà de Q_A^- , ainsi qu'une amélioration du fonctionnement du système antioxydant enzymatique (APX et MDHAR). Le prétraitement des plantules de la variété *Virginie* par une alternance de cycles courts de lumière/obscurité (16 min/ 8min) pendant trois jours lorsque les plantules sont au stade de trois feuilles, a amélioré leur tolérance face à la toxicité du clomazone. Ce prétraitement induit l'activation des systèmes de détoxification des ERO via l'augmentation des activités des enzymes antioxydants et la biosynthèse de composés antioxydants tels que l'ascorbate et les composés phénoliques et réduit le niveau de mort cellulaire programmée, induit par le stress photooxydatif. Il est supposé que la stimulation des voies alternatives de dissipation des électrons, telle que la photorespiration, ainsi que les modifications du cycle circadien, soient prioritairement impliquées dans l'acquisition de la tolérance. Cet effet dit de "priming" se maintient tout au long de la croissance du tabac et se manifeste par une augmentation de la croissance et de la photosynthèse nette qui perdure jusqu'au stade de la floraison.

Mots-clés: Alternance; Antioxydante; Clomazone; Détoxification d'ERO; Évolution d'oxygène chloroplastique; Fluorescence chlorophyllienne; Lumière; Mort cellulaire programmée; *Nicotiana tabacum* L.; Photosynthèse; Photosystème II; Priming; Stress photooxydatif; Test OJIP; Tolérance

Abstract

The effect of low doses of clomazone 2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one, a non-selective herbicide of the isoxazolidinone family, has been already determined in *Nicotiana tabacum* L. The plantlets of two varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*; *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) were subjected to low concentrations of clomazone (1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5}) μM in a hydroponic system. The photosynthetic electron transport has been studied by analyzing the rapid kinetics of chlorophyll *a* fluorescence and measuring changes in the chloroplast oxygen evolution. The results showed that clomazone at concentrations of 1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} μM affected several parameters of chlorophyll *a* fluorescence and OJIP test (F_v/F_m , PI_{abs} , $1-V_j$, ABS/RC , $TR0/RC$, $DI0/RC$, $ET0/RC$ and $ET0/ABS$). Clomazone at 1 μM led to a large accumulation of H_2O_2 in *Virginie* variety inducing programmed cell death. Our results show that *Xanthi* variety has a higher tolerance to clomazone as compared to *Virginie*, this can be explained by increasing the efficiency of electron transport beyond Q_A^- ($1-V_j$) as well as improving the function of antioxidant enzymes (APX and MDHAR). The pretreatment of *Virginie* plantlets (three leaf stage) with alternation of short cycles (16 min/ 8min) of light/dark (AL) for three days, has improved its tolerance to clomazone toxicity. This pretreatment stimulated ROS-detoxification systems by increasing the activity of antioxidant enzymes and the biosynthesis of antioxidant compounds such as ascorbate acid and phenolic compounds, and consequently reduced the level of programmed cell death (PCD) provoked by the stress photooxydatif. It is suggested that the stimulation of alternative pathways of electron dissipation, such as the photorespiration, as well as changes in the circadian cycle, are primarily involved in the acquisition of the tolerance. This effect so-called "priming" has maintained during the growth of tobacco and has been revealed by increases in the growth and net photosynthesis until the flowering stage.

Key-words: Antioxidant; Chlorophyll *a* fluorescence transients; Chloroplast oxygen evolution; Clomazone; Growth; Light alternation; *Nicotiana tabacum* L.; OJIP test; Photooxidative stress; Photosynthesis; Photosystem II; Programmed cell death; ROS detoxification; Tolerance

